

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : **2 695 563**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **92 10879**

(51) Int Cl⁶ : A 61 K 39/385, 47/48

(12) **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION** **A1**

(22) Date de dépôt : 11.09.92.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : INSTITUT PASTEUR — FR.

(72) Inventeur(s) : Gengoux Christine et Leclerc Claude.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 18.03.94 Bulletin 94/11.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Harlé & Phélip.

(54) Microparticules portant des antigènes et leur utilisation pour l'induction de réponses humorales ou cellulaires.

(57) Utilisation pour l'induction d'une réponse immunitaire de microparticules en matériau synthétique polymère portant en surface une ou plusieurs protéines liées de manière covalente pouvant porter un ou plusieurs épitopes, les densités de la ou des protéines à la surface des microparticules étant ajustées afin d'orienter la réponse immunitaire vers l'induction d'une réponse humorale et cellulaire ou vers l'induction d'une réponse majoritairement cellulaire.
Les microparticules ont un diamètre moyen compris entre environ 0,75 et environ 1,5 µm.

FR 2 695 563 - A1



La présente invention a pour objet des microparticules portant en surface des antigènes et leur utilisation pour l'induction de réponses humorales ou cellulaires.

Plus spécifiquement, l'invention concerne également des microparticules comportant, en surface, une densité importante d'antigènes.

Les cellules B qui expriment des récepteurs immunoglobulines spécifiques pour un antigène particulier sont hautement efficaces pour la présentation de cet antigène. (Rock et al. C., J.Exp. Med. (1984) 160; 1102; Hutchings et al. Eur. J. Immunol. (1987) 17:393). Par exemple, des cellules B spécifiques peuvent présenter la toxoïde tétanique à des cellules T à des concentrations en antigène 10^4 inférieures à celles requises pour la présentation par des cellules B non spécifiques ou des monocytes du sang périphérique. (Lanzavecchia, Nature, (1985) 314:537).

De plus, des études in vivo avec des souris déficientes en cellules B indiquent que ces cellules sont requises pour l'activation des cellules T des ganglions lymphatiques (Janeway et al. J. Immunol. (1987) 138:1051; Ron, et al. J., J. Immunol. (1987) 138:2848; Kurt-Jones et al. A.K. J. Immunol. (1987) 140:3773).

Les souris déficientes en cellules B présentent aussi des réponses réduites en ce qui concerne les cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ spécifiques de tumeurs, après immunisation par le virus de la leucémie murine de Freund (Schultz et al., Science, (1990) 291).

La capacité des cellules B à modifier et à présenter l'antigène en vue de la reconnaissance par des cellules T Helper $CD4^+$ restreintes au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC) forme la base d'un modèle d'activation des cellules B par les cellules T. (Noëlle et al. The FASEB Journal. (1991) 5:2770).

La reconnaissance par des cellules T Helper $CD4^+$ du complexe peptide-MHC de classe II à la surface des cellules B

permet la formation de conjugués stables physiquement entre les cellules T et les cellules B (Kupfer et al. S.J. Proc. National Acad. Sci. USA. (1986) 83:6080).

5 Cette reconnaissance directe a pour résultat la prolifération et la différenciation de cellules B en réponse à des lymphokines telles l'Interleukine-2, l'Interleukine-4 ou l'Interleukine-5.

10 L'induction de la réponse anticorps contre un antigène nécessite donc la présentation de l'antigène par des cellules B.

La plupart des études sur la présentation de l'antigène ont été effectuées en utilisant des protéines solubles telles que la toxoïde du tétanos, le lysozyme, l'hémocyanine (LH). Cependant, la plupart des antigènes auxquels le système
15 immunitaire est exposé, sont inclus dans des structures particulières complexes telles que des bactéries ou des parasites.

Il est bien établi que les cellules qui sont capables de phagocytose telles que les macrophages peuvent présenter
20 des antigènes bactériens à des cellules T.

Par contre, on ne sait pas si des cellules qui ne phagocytent pas, telles que les cellules B, peuvent présenter des antigènes complexes et de tailles importantes.

25 Il a été montré récemment que, in vivo, des antigènes bactériens devaient être mis sous une forme soluble, pour induire une réponse anticorps dépendante des cellules T (Leclerc et al. J. Immunol. (1990) 144:3174; Leclerc et al. J. Immunol. (1991) 147:3545).

30 Il convenait cependant d'établir encore qu'in vivo, les antigènes protéiques bactériens sont exclusivement présentés aux cellules T par des cellules phagocytaires et que les cellules B ne peuvent modifier des antigènes sous forme de particules.

35 A cet effet, on a comparé, selon la présente invention, la capacité de macrophages et de cellules B à présenter le

même antigène, sous une forme soluble et particulaire.

On a notamment utilisé des antigènes protéiques ,tels que le lysozyme et le TNP-LH, couplés à des microparticules de poly(acroléine) ou de polystyrène ayant une taille comparable
5 à celle d'une bactérie .

Selon l'invention, on a montré de manière surprenante que les cellules B qui présentent le TNP-LH ou le lysozyme de manière très efficace, sont incapables de présenter ces antigènes couplés à des billes. Par contre, les macrophages
10 présentent les deux formes d'antigènes aux cellules T.

L'étude de la présentation des antigènes et de l'induction de la réponse T cellulaire et/ou humorale a une importante scientifique et médicale particulière.

En effet, l'orientation vers une réponse purement
15 cellulaire ou une réponse purement humorale peut permettre de vacciner contre certains pathogènes, de modifier certains dysfonctionnements biologiques et de guérir certaines pathologies.

Par exemple, une telle orientation permettrait
20 d'éliminer des infections persistantes ou d'opérer une régulation des réponses allergiques .

De plus, il existe deux sous-populations de cellules T, CD4⁺, les Th1 et les Th2 qui ont des capacités différentes à produire diverses lymphokines (Mosmann , Cherwinski, Bond ,
25 Giedlin et Coffman, J. Immunol., 136, 2348-2357 (1986)) . L'induction de Th1 ou de Th2 joue un rôle majeur dans la résistance aux infections bactériennes, parasitaires ou virales . Ainsi, dans le cas de la leishmaniose cutanée murine, les Th1 protègent de l'infection alors que les Th2
30 aggravent la maladie . In vitro , les lymphocytes B stimulent de façon optimale la prolifération des clones Th2 alors qu'une forte prolifération des clones Th1 est observée avec les cellules adhérentes (Gajewski, Pinna, Wong et Fitch . J. Immunol., 146, 1750-1758 (1991)).

35 L'orientation de l'antigène vers la présentation par

des cellules B ou des macrophages peut permettre d'induire des réponses Th1 ou Th2.

Différentes techniques ont été développées jusqu'à présent pour induire une meilleure réponse immunitaire.

5 La plus ancienne des méthodes consiste à activer le système immunitaire à l'aide d'adjuvants. Ainsi, l'adjuvant de Freund permet d'augmenter l'intensité des réponses humorale et cellulaire . Cependant, de tels adjuvants présentent des
10 inconvénients majeurs dus à leur manque de spécificité, à leur toxicité et aux réactions immunologiques parasites qu'ils risquent d'induire, en raison de leur manque de pureté.

 Les iscomes (abréviation de l'expression immuno-stimulating complexes) sont composés d'un complexe antigénique et d'un adjuvant, le QuilA qui est extrait d'un arbre. Ces
15 particules ont un diamètre d'environ 35 nm et sont composées de sous-unités d'environ 12nm. Elles permettent d'induire une réponse immunologique mais le plus souvent les antigènes sont encapsulés et sont donc ensuite relargués dans le milieu extérieur. En outre, la technique ne permet pas un contrôle
20 précis du type de cellules présentant ces particules, et de ce fait ces particules induisent une double réponse humorale et cellulaire.

 Enfin, du point de vue pratique, on notera des difficultés de préparation, un manque de stabilité et une
25 toxicité importante de ces particules.

 Les liposomes dont l'utilisation a aussi été testée pour l'induction d'une réponse immunitaire présentent les mêmes inconvénients que les iscomes.

 Des microparticules biodégradables comme par exemple
30 des polymères d'acide lactique et glutamique ont aussi été développées (Aguado et Lambert, Immuno. Biol., 184, 113-125, (1992)). Ces microparticules libèrent au cours de leur dégradation , l'antigène sous forme soluble. Cette libération permet une présentation de l'antigène par diverses cellules et
35 l'induction d'une réponse humorale sans possibilité

d'orientation vers une réponse spécifiquement cellulaire.

Des particules constituées exclusivement de protéines recombinantes ont aussi été synthétisées. Ainsi, la demande de brevet français FR 2.635.532 décrit des particules composées d'une protéine hybride entre l'antigène HBs et une séquence immunogène supposée induire des anticorps neutralisants dirigés contre des virus HIV.

Des particules contenant la toxine de la poliomyélite ont aussi été fabriquées.

Ces particules présentent des inconvénients notables. Ainsi, il est très difficile d'insérer des séquences longues dans ces particules. De plus, elles induisent tant une réponse humorale que cellulaire et il n'est donc pas possible d'obtenir spécifiquement l'une des deux.

De plus, dans l'ensemble de ces travaux, le critère de la taille des particules n'a jamais été considéré comme critique . Cependant , des particules de petites tailles (nanoparticules) comme les particules HBs pourraient être présentées par les lymphocytes B. Au contraire, des particules de taille trop importantes (supérieures à 5-10 microns) ne peuvent pas être présentées par des cellules phagocytaires.

Les diverses solutions proposées dans l'état de la technique d'une part pour permettre une induction d'une réponse immunologique importante et d'autre part pour diriger cette réponse spécifiquement dans une des deux voies de réponse, humorale ou cellulaire, ne sont donc pas satisfaisantes.

L'invention propose de mettre au point des produits permettant d'obtenir une bonne réponse immunologique tout en ayant une orientation cellulaire ou humorale.

Selon l'invention, on a trouvé de manière surprenante qu'une telle réponse pouvait être induite à l'aide de microparticules , de faibles tailles et présentant des densités antigéniques variées.

La présente invention a particulièrement pour objet des

microparticules en matériau synthétique polymère portant en surface une ou plusieurs protéines liées de manière covalente au matériau constituant les microparticules, la ou lesdites protéines portant chacune un ou plusieurs épitopes et étant
5 présentes à une densité comprise entre 10^4 et 5.10^5 molécules/ μm^2 pour chacune des protéines.

L'invention concerne aussi les caractéristiques ci-après, considérées isolément ou selon toutes leurs combinaisons techniquement possibles:

10 Le couplage des protéines antigéniques ou microparticules doit être covalent pour éviter la libération sous forme soluble de l'antigène.

Les microparticules ont avantageusement un diamètre moyen compris environ entre $0,75 \mu\text{m}$ et $1,5 \mu\text{m}$, et
15 préférentiellement d'environ $1 \mu\text{m}$ afin de pouvoir être présentées aux lymphocytes T, CD4^+ par des cellules phagocytaires mais pas par des lymphocytes B .

Lesdites microparticules sont plus particulièrement caractérisées en ce que la liaison covalente est réalisée par
20 réaction des fonctions NH_2 et/ou CO des protéines et du matériau constituant la microparticule.

Avantageusement une telle liaison se fera par l'intermédiaire d'un agent pontant, tel que par exemple le glutaraldéhyde ou le carbodiimide. Néanmoins, tout autre agent
25 bifonctionnel permettant une telle liaison peut être utilisé. De tels agents sont connus, voir par exemple Synthetic polypeptides as antigens , M.H. Von Regenmortel, J.P. Briand, S. Muller and S.Plane 1988 (Elsevier).

Le matériau constituant la microparticule est
30 avantageusement un polymère biocompatible, tel qu'un polymère acrylique, par exemple la polyacroléine ou le polystyrène ou des poly(alpha-acides hydroxyques), des copolymères d'acides lactiques et glycoliques , ou des polymères d'acides lactiques.

35 On entend par polymère tout homopolymère ou hétéro- ou

copolymère.

Il doit permettre un couplage covalent des protéines au matériau et ne doit pas entraîner de réaction de rejet ou de toxicité de la part de l'organisme auquel il pourrait être injecté. Avantageusement, il s'agit, pour l'application en thérapeutique humaine, d'un polymère biodégradable, par exemple un polymère pouvant être dégradé par les cellules possédant des enzymes lysozomiaux, telles que les macrophages.

De tels matériaux biodégradables peuvent être des polymères d'acide lactique et glutamique ou des polymères utilisés pour des usages biomédicaux, et en particulier ceux utilisés dans les sutures.

Une telle microparticule peut porter à sa surface outre des protéines antigéniques, des molécules susceptibles d'activer le système immunitaire, telles que des interleukines, en particulier l'interféron-gamma ou l'interleukine 4.

Ces microparticules peuvent porter une ou plusieurs protéines qui peuvent elles-mêmes comprendre chacune un ou plusieurs épitopes. De tels protéines peuvent être des glycoprotéines, des peptides synthétiques contenant un épitope ou plusieurs épitopes, ou toute autre molécule non protéique ou contenant une partie protéique pouvant induire une réponse immunitaire.

L'invention a pour autre objet des médicaments ou vaccins comprenant les microparticules décrites ci-dessus, ainsi que des compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles les comprennent, en association avec des diluants ou des adjuvants pharmaceutiquement compatibles.

La présente invention est de manière générale relative à l'utilisation de microparticules en matériau synthétique polymère portant en surface une ou plusieurs protéines liées de manière covalente, la ou lesdites protéines portant chacune un ou plusieurs épitopes T ou B, pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin pour l'induction d'une réponse

immunitaire, selon laquelle les densités de la ou des protéines à la surface des microparticules sont ajustées afin d'orienter ladite réponse immunitaire vers une réponse majoritairement humorale ou majoritairement cellulaire.

5 Sous un autre aspect, l'invention a aussi pour objet un procédé pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin dont la réponse immunitaire est soit majoritairement humorale soit majoritairement cellulaire, de type Th1 ou Th2, ledit
10 procédé étant caractérisé en ce qu'on fixe de manière covalente sur des microparticules ou billes en matériau synthétique polymère au moins une protéine portant un ou plusieurs épitopes en faisant varier la densité de la protéine fixée à la surface selon le type de réponse désirée.

15 Afin d'induire une réponse cellulaire et humorale, on utilisera préférentiellement des microparticules présentant une densité pour chacune des protéines portant un épitope d'au minimum 10^5 et préférentiellement d'environ $5 \cdot 10^5$ molécules/ μm^2 . De telles densités correspondent environ pour
20 une bille d'un diamètre de $1\mu\text{m}$ à des quantités de protéines à la surface de la microparticule respectivement de 10^5 et $4 \cdot 10^5$ molécules .

25 En vue de l'induction d'une réponse majoritairement cellulaire, CD4^+ , classe II restreinte, on utilisera, préférentiellement, des microparticules présentant une densité pour chacune des protéines portant un épitope comprise entre environ 10^4 et $5 \cdot 10^4$ molécules de protéines/ μm^2 .

Les autres caractéristiques de ces microparticules sont celles mentionnées plus haut concernant les microparticules à haute densité.

30 Les protéines et antigènes liés de manière covalente aux microparticules dépendent de l'application prévue desdites microparticules.

Elles dépendent également du type de réponse immunitaire que l'on souhaite induire, mais aussi de la
35 maladie ou de l'affection que l'on souhaite traiter ou dont on

souhaite prémunir le sujet.

A titre d'exemple, on pourra utiliser les épitopes de la région Pre S2 de l'antigène HBS du virus de l'hépatite virale dont les séquences sont les suivantes:

- 5 - épitope T: Pre S:T (120-132)

MQWNSTTFHQTLQ

- 10 - épitope B: Pre S:B (132-145)

QDPRVRGLYFPAGG

15 On peut aussi citer à titre d'exemples les épitopes de la protéine VP1 du virus de la poliomyélite dont les séquences sont les suivantes:

- épitope T: C3:T (103-115)

20

KLFAVWKITYKDT

- épitope B: C3:B (93-193)

25

DNPASTTNKDK

Un autre exemple de séquence est l'épitope de la boucle V3 de la protéine GP120 du virus HIV1 dont la séquence est la suivante:

30

- épitope T + B: boucle V3

INCTRPNNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKIGNMRQAHNCNI

35

On utilisera préférentiellement les épitopes B pour induire une réponse humorale à l'aide de microparticules à forte densité et les épitopes T pour induire une réponse majoritairement cellulaire à l'aide de microparticules à faible densité en protéines de surface.

40

De telles microparticules seront injectées aux patients que l'on veut traiter de manière thérapeutique ou prophylactique par les moyens connus de l'homme du métier, par exemple par injection sous-cutanée, intrapéritonéale,

intraveineuse, ou par tout autre moyen permettant d'induire une réponse immunitaire.

On se reportera à ce sujet à Current protocols in immunology , (Edited by J.F. Coligen, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober Wiley- Intersciences Editors) dans lequel sont répertoriées les techniques d'immunisation.

Un des avantages particuliers de la présente invention réside dans le fait qu'elle permet d'induire des réponses immunitaires humorale ou cellulaire sans adjonction d'adjuvants aux billes ou microparticules. Néanmoins, l'adjonction d'adjuvants non toxiques et n'entraînant pas de réaction immunitaire parasite est aussi envisageable dans le cadre d'une utilisation selon la présente invention.

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples qui suivent dans lesquels:

Les diagrammes de la Figure 1 sont des résultats d'analyses par fluorométrie (FACS) de microparticules portant des antigènes LH ou TNP-LH. Les ordonnées indiquent l'anticorps utilisé (PBS-témoin, anti-LH, anti-TNP). Les abscisses indiquent les types de microparticules testées: B (LH), B (TNP-LH), B (OVA) et B (OVA-TNP) qui correspondent à des microparticules sur lesquelles sont liés respectivement le LH, le TNP-LH, l'ovalbumine et l'ovalbumine-TNP.

Les figures 2A à 2D représentent la capacité de cellules de rate, de macrophages et de cellules spécifiques B du TNP et activées par le LPS à présenter respectivement le LH, le TNP-LH, des microparticules portant du LH et des microparticules portant le TNP-LH.

La Figure 3 est une courbe indiquant les réponses prolifératives de cellules ganglionnaires de souris immunisées par le lysozyme soluble et stimulées in vitro par le lysozyme soluble (figure 3A) ou par des microparticules portant le lysozyme de diamètres 0,25, 0,75 et 1,5 μ m (figure 3B) . La prolifération cellulaire est mesurée par l'incorporation de

thymidine (CPM) en ordonnées, tandis que la dilution des microparticules est indiquée en abscisses.

La Figure 4 représente la production d'IL2/IL4 par un hybridome spécifique du lysozyme après stimulation par du lysozyme soluble (figure 4A) ou par des microparticules portant du lysozyme (figure 4B) . Les concentrations des microparticules sont indiquées en abscisses, tandis que la prolifération est indiquée en ordonnées.

Les Figures 5A et 5B représentent l'activation de l'hybridome T spécifique du lysozyme mesurée par la production d'IL2/IL4 après stimulation par le lysozyme soluble (figure 5A) ou couplé aux microparticules (figure 5B) en présence de splénocytes ou de cellules B(A20) comme cellules présentant l'antigène.

Les Figures 6A et 6B représentent la prolifération in vitro après stimulation par le lysozyme soluble de cellules de ganglions inguinaux de souris immunisées respectivement par du lysozyme soluble en adjuvant complet de Freund (Figure 6A) et par du lysozyme couplé à des microparticules (Figure 6B).

Les figures 7A et 7B représentent la prolifération in vitro après stimulation par le lysozyme de cellules de ganglions inguinaux de souris immunisées par diverses concentrations de lysozyme soluble (7A) ou couplé à des microparticules (7B).

La figure 8 représente la prolifération de cellules ganglionnaires de souris immunisées par le lysozyme en adjuvant complet de Freund ou en PBS en présence de microparticules couplées au LH .

Les Figures 9A et 9B représentent respectivement les taux d'anticorps anti-lysozyme (Figure 9A) et d'anticorps anti-LH (Figure 9B) de souris immunisées avec du lysozyme et de l'adjuvant alun , des microparticules portant du lysozyme ou des microparticules portant du LH.

La Figure 10 représente la prolifération de cellules de souris immunisées par injection de lysozyme en présence

d'adjuvant de Freund , après stimulation in vitro par des microparticules portant du lysozyme à différentes densités.

La Figure 10B représente la prolifération in vitro de cellules de souris immunisées in vivo par du lysozyme ou des billes portant du lysozyme après stimulation par différentes concentrations de lysozyme.

La Figure 11 est un diagramme illustrant la production d'anticorps anti-lysozyme de cellules de souris immunisés par injection de lysozyme et d'adjuvant de Freund ou de microparticules portant du lysozyme.

EXEMPLE 1:

Préparation de billes couplées à LH ou à l'ovalbumine.

1. Matériel et méthodes et présentation par des cellules B ou par des macrophages .

Les souris sont des femelles BALB/c et DBA/2 âgées de 6 à 8 semaines.

Les antigènes sont le LH et l'ovalbumine (OVA) commercialisés par Sigma Chemical (St-Louis, USA). L'hémocyanine trinitrophénylée (TNP4-LH) a été préparée telle que décrit précédemment (Shutze et al., J. Immunol. (1989) 142:2635).

1.1 Couplage covalent des antigènes ou microparticules de poly(acroléine).

Des microparticules de poly(acroléine) d'un diamètre compris entre 0,25 et 1,5 μ m, commercialisées par Polysciences Inc. (Washington PA), sont couplées à l'ovalbumine ou au LH comme décrit précédemment (Rembaum et al. Immunol. (1982) 52:341; Ziegler et al. Eur. J. Immunol. (1987) 17:1287).

1 ml de ces microparticules est lavé deux fois dans du PBS et resuspendu dans 1 ml de LH ou d'ovalbumine (5 mg/ml dans du PBS). Après trois heures d'incubation à température ambiante, les microparticules sont lavés deux fois dans du PBS et resuspendus dans 2 ml de PBS contenant 1% de sérum albumine bovine (BSA) et des antibiotiques. Les microparticules ainsi obtenues sont stockées à 4°C jusqu'à utilisation.

Les microparticules portant les antigènes TNP-OVA ou TNP-LH sont préparées par incubation de microparticules portant l'OVA ou le LH avec du TNBS (Trinitrobenzène sulfonate).

5 2 ml des microparticules qui ont été couplées au LH ou à l'ovalbumine sont lavés deux fois dans du PBS et resuspendus dans 2 ml de tampon cacodylate contenant 10 mg/ml de TNBS. Les microparticules sont incubées 30 minutes dans l'obscurité à la température ambiante et lavées trois fois dans du PBS. Elles
10 sont resuspendues dans 2 ml de PBS contenant 1% de BSA et des antibiotiques et stockées à 4°C.

1.2 Analyse par cytofluorométrie de flux.

50 µl de microparticules sont lavés deux fois dans du PBS contenant 1% de BSA et incubés durant 40 minutes à 4°C
15 avec du sérum de souris anti-LH ou anti-TNP. Après deux lavages, les microparticules sont incubées avec des anticorps de chèvre couplés au FITC (fluoroisothiocyanate) dirigés contre des immunoglobulines de souris (Biosys, Compiègne, France) durant 40 minutes à 4°C.

20 Après quatre lavages, les microparticules sont resuspendues dans 1 ml de PBS contenant 1% de BSA.

L'intensité de fluorescence est mesurée en utilisant le cytomètre de flux FACSCAN (Becton Dickinson, Mountain View.CA).

25 1.3 Milieu de culture.

Les lymphocytes sont cultivés dans du RPMI 1640 (Seromed, Munich, FRG) complémentés avec de la L-glutamine 2mM, 10% de FCS (sérum de veau foetal) inactivé par la chaleur, du 2-ME 50µM et des antibiotiques.

30 1.4 Etablissement de la lignée cellulaire Th spécifique du LH.

Cette lignée cellulaire est établie et maintenue selon le protocole décrit par Taylor et al. (ed. IRL Press. New York) et Galelli et al. (J. Immunol. (1990) 145:2397).

35 Des cellules de ganglions inguinaux (4×10^6 /ml) de

souris DBA/2 ayant subi 8 jours avant le prélèvement des cellules, une injection de 100 µg de LH en émulsion dans de l'adjuvant complet de Freund à la base de la queue ont été cultivées durant 4 jours dans du milieu de culture en présence de LH (100 µg/ml).

Les cultures sont incubées dans une atmosphère humide à 7,5% de CO₂ à 37°C.

Une lignée cellulaire a été établie à partir de cette culture initiale par des passages en série de cellules T purifiées sur Ficoll ($2 \cdot 10^5$ /ml) en présence de cellules de rate de souris DBA/2 irradiées (3000 rad) durant 6 à 8 jours (période de repos) ou avec des cellules de rate irradiées plus du LH (100 µg/ml) durant 4 jours (période de stimulation).

Les cellules T utilisées dans les expériences sont récoltées 8 à 10 jours après leur dernière mise en présence du LH.

1.5 Estimation de la prolifération des cellules Th.

Des cultures en triplicats contenant $5 \cdot 10^4$ cellules Th purifiées sur Ficoll, et $5 \cdot 10^4$ cellules B mémoire spécifiques du TNP purifiées et irradiées (900 rad), ou $5 \cdot 10^5$ cellules de rate totales irradiées (3000 rad), ou 10^5 cellules de rate adhérentes irradiées (3000 rad), ou 10^5 cellules B de lymphome A20 positives pour le MHC de classe II irradiées (3300 rad) (Kim et al. J. Immunol. (1979) 122:549), ou 10^5 cellules B vierges spécifiques du TNP et activées par le LPS comme source de cellules présentant les antigènes, et différentes concentrations d'antigène ont été incubées dans des plaques de microculture à fond plat (Corning, Cambridge, MA) sous un volume total de 0,2 ml/puits de milieu complet. La prolifération cellulaire T a été estimée par incorporation de la thymidine tritiée durant les huit dernières heures d'une culture de 3 jours.

Les résultats sont exprimés comme la moyenne géométrique de trois cultures, une fois éliminé le bruit de fond. L'écart type est inférieur à 15 % de la moyenne.

1.6 Cellules B spécifiques du TNP.

Les cellules B spécifiques du TNP de souris normales sont purifiées par liaison et élution sur une gélatine-TNP8 et selon la technique décrite par Haas et Layton J.E., J. Exp. Med. (1975) 141:1004.

Ce protocole a été modifié afin d'obtenir des populations enrichies en cellules B mémoires spécifiques du TNP à partir de la rate de souris précocement immunisées, comme précédemment décrit (Galelli et al. J. Immunol. (1990) 145:2397). Les cellules B mémoire spécifiques du TNP ont été sélectionnées sur de la gélatine portant un haptène (gélatine-TNP2), en testant l'affinité des récepteurs pour le TNP par comparaison aux cellules B vierges, et la capacité à sécréter de larges quantités d'immunoglobulines G anti-TNP en présence de faibles concentrations d'antigènes.

10^8 cellules de rate ne contenant ni érythrocytes ni cellules mortes ont été suspendues dans 3 ml de HEPES (50 mM) tamponnées par du DMEM (Seromed, Munich, Allemagne) et incubées dans des boîtes de Pétri en plastique recouvertes de gélatine-TNP2. Les boîtes sont agitées de manière douce durant 15 minutes à 4°C, puis lavées 10 fois par du DMEM à la température de la glace. Les cellules adhérentes sont éluées en ajoutant 5 ml de DMEM réchauffé à 37°C et la gélatine-TNP liée est éliminée par digestion par la collagénase (Collagenase CLSIII de Worthington Biochemicals Freehold, New Jersey, 100 U/ml) durant 15 minutes à 37°C.

Ce protocole conduit à l'obtention finale, exprimée comme un pourcentage par rapport au nombre de cellules de rate d'origine, de 0,3 à 0,6 % de cellules liant le TNP à partir de rate de souris immunisées. Les cellules sont cultivées toute la nuit avant l'addition d'autres cellules et réactifs afin de permettre la réexpression d'immunoglobulines de surface modifiées par le traitement par la collagénase. La présence de récepteurs libres du TNP sur ces cellules est évaluée par leur capacité à lier des érythrocytes portant à leur surface du

TNP.

55 à 76 % des cellules obtenues à partir de souris immunisées forment des rosettes avec des SRBC modifiées par le TNP. Ces cellules ne prolifèrent pas en réponse à la concanavaline A mais sont enrichies 20 fois, pour les cellules qui secrètent les immunoglobulines G anti-TNP après stimulation par TNP-LH, par comparaison aux cellules de rate non fractionnées.

10 1.7 Cellules B vierges spécifiques du TNP et activées par le LPS

Des cellules B vierges spécifiques du TNP de souris et non immunisées ont été purifiées par liaison puis élution sur de la gélatine-TNP8 comme décrit précédemment. Ces cellules ont été cultivées à une densité de $2 \cdot 10^6$ par ml dans un milieu contenant 50 $\mu\text{g/ml}$ de LPS (Salmonella enteritidis, Difco Laboratories, Détroit, MI) durant 3 jours. Les lymphoblastes non adhérents ont été purifiés en utilisant du Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Piscataway, NJ), puis lavés et utilisés comme cellules accessoires.

20 1.8 Macrophages.

Les macrophages ont été obtenus à partir de cellules de rate non immunisées par adhésion durant 4 heures à 37°C suivie d'un lavage des cellules afin d'éliminer les cellules non adhérentes tel que décrit précédemment (Kakiochi et al. J. Immunol. (1983) 131:109).

25 2. Résultats.

2.1 Vérification du couplage de l'antigène aux microparticules.

30 Le LH a été couplé de manière covalente à des microparticules de polyacroléine d'un diamètre de 0,25 à 1,5 μm . Le couplage du LH aux microparticules a été contrôlé par analyse en cytofluorométrie de flux en utilisant un sérum de souris anti-LH.

35 Les résultats obtenus avec des microparticules de 1,5 μm sont indiqués sur la Figure 1.

Les microparticules de 1,5 μm ont été couplées à l'ovalbumine (B OVA) ou à la LH (B LH). Les microparticules TNP-OVA ou TNP-LH (respectivement désignées B(TNP-OVA), B (TNP-LH) ont été préparées par incubation de microparticules portant l'OVA ou le LH avec du TNBS. L'analyse par cytofluorométrie a été effectuée sur des microparticules incubées en présence de PBS ou en présence de sérum de souris anti-LH ou anti-TNP. Après lavage, les microparticules ont été incubées avec des anticorps de chèvre liés au FITC dirigés à l'encontre des immunoglobulines de souris et ont été analysées par cytométrie de flux.

Des résultats similaires ont été obtenus avec des microparticules de 0,25 et 0,75 μm .

Les microparticules témoins couplées avec de l'ovalbumine n'ont pas été reconnues par le sérum anti-LH.

2.2. Comparaison de la capacité de diverses populations de splénocytes à présenter des antigènes solubles ou particulaires.

La capacité de splénocytes non fractionnés, de macrophages et de cellules B vierges spécifiques pour le TNP a été comparée quant à leur présentation de LH et de TNP-LH soluble ou particulaire à des cellules T spécifiques du LH.

Dans ces expériences, des populations de splénocytes ont été préparées à partir de souris non immunisées. Après purification, les cellules B spécifiques du TNP ont été activées durant trois jours par du LPS; on sait en effet que les lymphoblastes induits par le LPS sont des cellules très efficaces quant à la présentation d'un antigène (Kakiochi et al. J. immunol. (1983) 131:109).

Les résultats sont illustrés sur la Figure 2 pour laquelle $5 \cdot 10^5$ splénocytes irradiés, 10^5 cellules adhérentes ou 10^5 cellules B vierges spécifiques du TNP activées par le LPS ont été cultivées avec $5 \cdot 10^4$ cellules Th spécifiques du LH en présence de quantités variées de LH soluble (A), de TNP-LH soluble (B) ou fixés sur des microparticules (B (LH) (C) ou de

B (TNP-LH) (D)). La prolifération cellulaire Th a été estimée au jour 3.

Comme le montre la Figure 2 (2A et 2B), les macrophages et les cellules B activées par le LPS stimulent de manière efficace les cellules T quand ils sont incubées avec du LH ou du TNP-LH solubles.

Contrairement à ces résultats, seuls les macrophages, et non les cellules B spécifiques du TNP et activées par le LPS sont capables de stimuler les cellules T spécifiques du LH (Figures 2 C et D) quand des microparticules portant du LH ou du TNP-LH sont utilisées.

Ces résultats montrent que les macrophages sont responsables de l'activité de présentation de l'antigène des cellules spléniques quand des antigènes particuliers sont utilisés.

Ainsi l'incapacité de cellules B spécifiques du TNP à présenter l'antigène particulaire a été illustrée.

EXEMPLE 2.

Induction d'une réponse proliférative T, CD4⁺ spécifiques du lysozyme in vivo et in vitro par des microparticules couplées au lysozyme .

1. MATERIELS ET METHODES.

1.1 Antigènes

Le lysozyme (LYSO) et l'hémocyanine de Limulus (LH) proviennent des Laboratoires Sigma.

1.2 Couplage de l'antigène aux microparticules

L'antigène soluble est rendu particulaire par couplage à des microparticules (Polysciences) de 0.2 à 1µm de diamètre. Deux méthodes de couplage sont utilisées:

1.2 a) Couplage covalent directement sans agent activant.

Les billes ou microparticules de polyacroléine portent des groupements aldéhyde capables de réagir spontanément avec les fonctions amines des protéines.

1 ml de billes est lavé 4 fois dans du PBS, et repris dans 1 ml d'antigène à 5 mg/ml. Après 3 heures d'incubation à

température ambiante, les billes sont lavées 3 fois dans du PBS et incubées 30 minutes dans 1 ml de PBS-Albumine humaine 1% afin de saturer les groupements réactifs libres des billes. Puis après lavage, les particules sont reprises dans 2 ml de PBS-albumine humaine 1%-antibiotique 1% puis conservées à +4°C.

b) Couplage covalent par le glutaraldéhyde.

L'antigène est couplé aux billes de polystyrène par le glutaraldéhyde, capable de former une base de Schiff avec les groupements amines des protéines.

0,5 ml de billes est lavé 3 fois dans du PBS et repris dans 0,5 ml de glutaraldéhyde 8%. Après 6 heures d'incubation à température ambiante, les billes sont lavées 2 fois et reprises dans 1 ml d'antigène à 400µg/ml. Après incubation pendant la nuit à température ambiante, les billes sont lavées et incubées avec 1 ml d'éthanolamine 0,2 M pendant 30 minutes afin de bloquer les fonctions aldéhyde libres du glutaraldéhyde.

Après un dernier lavage, les particules sont reprises dans 1 ml de PBS- albumine humaine 1%-antibiotique 1% puis conservées à +4°C.

Cette méthode de couplage permet de déterminer la quantité de protéines couplées sur les microparticules par spectrophotométrie. Les absorbances de la solution de protéine à 400 µg/ml et du surnageant obtenu après l'incubation des billes avec cette solution de protéine sont mesurées à 280 nm. Connaissant le nombre de billes utilisées pour le couplage, on considère que la différence entre la quantité de protéine avant couplage et la quantité résiduelle après couplage, permet d'estimer la quantité de lysozyme couplée par particule.

1.3 Protocole d'immunisation.

On a utilisé des femelles BALB/c, d'haplotype H-2^d, âgées de 6 à 8 semaines (élevage de l'Institut Pasteur).

- immunisation par voie intra-péritonéale: on injecte

100 µg de lysozyme avec 1 mg d'alum, ou, différentes quantités d'antigène couplé aux billes sans adjuvant,

5 - immunisation par voie sous-cutanée: à la base de la queue, on injecte 100 µg de lysozyme en émulsion dans l'adjuvant complet de Freund, ou, différentes quantités d'antigène couplé aux billes.

Le sérum de chaque souris est prélevé 7 ou 14 jours après chaque injection. La teneur en anticorps des sérums est mesurée par test ELISA.

10 La réponse proliférative cellulaire est mesurée sur les ganglions inguinaux et/ou sur la rate, prélevés 7 et/ou 14 jours après chaque injection.

1.4 Détection des anticorps par ELISA.

15 L'antigène (lysozyme) est incubé à la concentration de 5µg/ml en tampon carbonate 50 mM-pH=9.6, dans des microplaques (Nunc) pendant une nuit à 4°C. Après lavage avec un tampon PBS-Tween 20 à 0,01%, les différentes dilutions des sérums à tester, réalisées en tampon BSA 1%, sont incubées pendant 1 heure à 37°C. Après lavage, on dépose 100 µl par puits d'un
20 conjugué anti-Ig de souris (anti-Ig totales fournis par Diagnostics Pasteur et anti-Ig spécifiques par Sigma), marqué à la peroxydase, préparé chez la chèvre; qui est incubé pendant 1 heure à 37°C. Après lavage, on ajoute la solution de substrat préparée extemporanément: Orthophénylènediamine à 0,5
25 mg/ml (Sigma) en tampon acide citrique 0.1 M-phosphate disodique 0.2M-pH=5 auquel on ajoute H₂O₂ au 1/2500.

Une coloration jaune révèle la présence d'anticorps spécifiques; la réaction enzymatique est arrêtée 8 minutes plus tard, par 50 µl de H₂SO₄ (11,5%).

30 L'absorbance de chaque puits est mesurée à 492 nm, par un lecteur de densité optique (Dynatech). Le contrôle négatif est réalisé avec du sérum au 1:100 de souris BALB/c non immunisées. Les résultats sont exprimés: soit en DOx1000 à partir de l'absorbance mesurée, corrigée de l'absorbance en
35 absence de sérum; soit par le titre en anticorps calculé à

partir de régression linéaire basée sur l'absorbance obtenue avec le sérum de souris BALB/c non immunisées.

5 Lorsque l'antigène est sous forme particulaire, le test ELISA est réalisé en tubes. Les dilutions des sérums à tester sont incubées directement avec l'antigène couplé aux billes (8.10^8 particules/ml). Les lavages se font par centrifugation dans le tampon PBS-Tween 20 (0.01%). Lorsque la réaction enzymatique est terminée, 200 μ l de chaque tube sont transférés en microplaque puis l'absorbance est mesurée.

10 1.5 Inhibition de la fixation des anticorps anti-lysozyme par test ELISA.

Le test ELISA mesure la fixation des anticorps spécifiques présents dans le sérum de souris BALB/c immunisées par le lysozyme. Cette fixation est diminuée si le sérum est préincubé (avant le test ELISA) avec l'antigène: lysozyme soluble ou couplé aux billes, qui se comporte alors, comme un inhibiteur.

20 Le sérum anti-lysozyme est préincubé avec le lysozyme soluble ou couplé aux billes, pendant 1 heure à 37°C puis la nuit à 4°C; la réaction se faisant en tubes. La fixation des anticorps non-liés à l'inhibiteur est évaluée par test ELISA (triplicats) en microplaques, dont les puits ont été recouverts par du lysozyme à 5 μ g/ml. L'absorbance de chaque puits est mesurée à 492 nm, et corrigée de l'absorbance en absence de sérum. Le contrôle négatif est réalisé avec du sérum au 1:100 de souris BALB/c non immunisées. L'absorbance sans inhibiteur lors de la préincubation de sérum, correspond à la fixation maximale d'anticorps anti-lysozyme.

25 Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de fixation des anticorps et calculé selon le rapport

$$\frac{\text{DO sans inhibiteur} - \text{DO avec inhibiteur}}{\text{DO sans inhibiteur}}$$

DO sans inhibiteur

35 La détermination graphique de la concentration de lysozyme soluble ainsi que du nombre de billes couplées au

lysozyme, nécessaire pour 50% d'inhibition, permet d'estimer la quantité de lysozyme fixée par particule.

1.6 Stimulation d'un hybridome T spécifique du lysozyme

5 Un hybridome T a été produit par immunisation de souris BALB/c avec du lysozyme. Il reconnaît spécifiquement le peptide 108-116 du lysozyme, en association avec les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II I-E^d.

10 10^5 cellules d'hybridome T sont stimulées par des concentrations croissantes d'antigène: lysozyme ou billes couplées, en présence de différentes cellules présentatrices de l'antigène: $5 \cdot 10^5$ splénocytes irradiés (3000 rad) de souris BALB/c ou 10^5 cellules de lymphome B A20, restreintes par les molécules de CMH de classe II. Les cellules sont mises en
15 culture (triplicats) dans un milieu complet RPMI 1640 (SEROMED) additionné de 10% de sérum de veau foetal décomplémenté, 50 μ M de β -mercaptoéthanol, 2mM de glutamine, 100 UI/ml de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine, en microplaque à fond plat (Corning 25860). Le témoin positif est
20 réalisé par stimulation de l'hybridome par le mitogène de lymphocytes T: concanavaline A à 5 μ g/ml.

Le surnageant est prélevé après 24h de culture à 37°C (7.5%CO₂), puis congelé à - 20°C pendant 16h minimum. La stimulation de l'hybridome est mesurée par la teneur en IL2 du
25 surnageant dans un test de prolifération de cellules CTL-L. Les écarts types ne sont pas mentionnés, car l'erreur est inférieure à 10% de la moyenne des triplicats.

1.7 Dosage de l'IL2 et de l'IL4

La lignée CTL-L est dépendante de l'Interleukine 2 et
30 de l'Interleukine 4; elle est maintenue en culture en milieu complet enrichi de 20% de surnageant de splénocytes de rat, incubés 36h avec 2,5 μ g/ml de concanavaline A.

Après décongélation, les surnageants de cultures (testés au 1/2) sont incubés en présence de $2,25 \cdot 10^4$ cellules
35 CTL-L, préalablement lavées trois fois dans le milieu

RPMI1640, pendant 3 jours à 37°C (7,5% CO₂).

La prolifération cellulaire est mesurée par addition de thymidine tritiée d'activité spécifique 1 Ci/mmele, à raison de 2 µCi/ml de culture, pendant les 16 dernières heures de culture.

L'ADN des cellules est récupéré après lyse des cellules et filtration à l'aide d'un "Skatron". L'incorporation de radioactivité est comptée par scintillation à l'aide d'un compteur-bêta.

Les résultats sont exprimés en cpm à partir de la moyenne des triplicats, corrigée de la radioactivité incorporée en l'absence d'antigène.

1.8 Test de prolifération

La rate et/ou les ganglions inguinaux sont prélevés stérilement 7 ou 14 jours après l'immunisation des souris (voir protocole d'immunisation). 8.10⁵ cellules sont incubés en présence de différentes concentrations d'antigène, soluble ou couplé aux billes. Les cellules sont mises en culture (triplicats) dans du milieu RPMI 1640 (SEROMED) additionné de 1.5% de sérum de veau foetal décomplémenté, 0,5% de sérum normal de souris, 50 µM de β2-mercaptoéthanol, 2mM de glutamine, 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine; en microplaques (Corning 25860) pendant 4 jours à 37°C (7,5% CO₂).

La prolifération des cellules est mesurée par incorporation de thymidine tritiée, d'activité spécifique 25 Ci/mmele, à raison de 2 µCi/ml de culture, pendant les 16 dernières heures. L'ADN des cellules est récupéré après lyse des cellules et filtration à l'aide d'un Skatron, l'incorporation de radioactivité est comptée par scintillation à l'aide d'un compteur-bêta.

Les résultats sont exprimés en cpm à partir de la moyenne des triplicats, corrigée de l'incorporation en absence d'antigène.

2 - RESULTATS.

2.1. Stimulation par le lysozyme couplé aux microparticules de cellules ganglionnaires de souris immunisées par le lysozyme.

5 Dans les essais illustrés aux Figures 3A et 3B, des souris BALB/c ont été immunisées par injection sous-cutanée à la base de la queue avec du lysozyme soluble complémenté avec de l'adjuvant de Freund (CFA) .

Après 14 jours, les ganglions inguinaux ont été prélevés, et la réponse proliférative de ces cellules a été testée in vitro contre différentes concentrations de lysozyme ou contre différentes concentrations de microparticules couplées au lysozyme . Les résultats sont exprimés en cpm corrigés de la valeur obtenue sans antigène.

15 Le lysozyme soluble induit une prolifération importante des cellules de souris immunisées par cet antigène en adjuvant de Freund (3A). La stimulation in vitro de ces mêmes cellules par les microparticules-lysozyme révèle que celles-ci sont capables d'induire une très forte prolifération cellulaire (figure 3B). Les microparticules de plus grand diamètre , 0,81 et 0,96 μm (couplage spontané) , sont très efficaces.

20 2.2. Stimulation par le lysosyme couplé aux billes de l'hybridome T .

Les figures 4A et 4B correspondent aux résultats de stimulation de l'hybridome T, spécifique du lysozyme par le lysozyme soluble (4A) ou couplé aux microparticules (4B). Le degré de stimulation de l'hybridome a été mesuré par le taux d'IL-2/IL-4 produites .

En présence de splénocytes irradiés, l'hybridome T est stimulé fortement par le lysozyme soluble (figure 4A). En présence de ces cellules , les microparticules-lysozyme de grande taille (0,81 et 0,96 μm) entraînent également une production d'IL-2/IL-4 importante (figure 4B), contrairement aux microparticules de 0,5 et 0,25 μm qui ne sont pas capables de stimuler l'hybridome T spécifique.

2.3. Incapacité des cellules A20 de lymphome B à présenter le lysozyme couplé aux billes à l'hybridome T, spécifique du lysozyme.

On sait que des tumeurs cellulaires B portant des récepteurs Ia peuvent être utilisés comme cellules présentant des antigènes pour des antigènes qui n'ont pas de réactivité avec le récepteur Ig mais qui sont fixés par les tumeurs de cellules B par des mécanismes non spécifiques (Walker et al. J. Immunol. (1982) 128:2164; Glimcher et al. J. Exp. Med. (1982) 155:445; Mac Kean et al. J. Exp. Med. (1981) 154:1419; Mac Kean et al. J. Exp. Med. (1981) 154:1419).

On a donc testé la capacité d'une de ces tumeurs cellulaires B, la lignée A20, à présenter le lysozyme sous forme soluble ou particulaire .

La présentation du lysozyme soluble ou particulaire a été comparée en utilisant deux sources de CPA : soit une source hétérogène, les splénocytes totaux irradiés, soit des cellules B provenant du lymphome A20. Lorsque l'antigène est sous forme soluble (figure 5A), il peut stimuler l'hybridome T aussi bien en présence de splénocytes que des cellules B A20. Au contraire, le lysozyme particulaire est présenté uniquement par les splénocytes et non par les cellules B A20 (figure 5 B).

Ces résultats confirment que les splénocytes peuvent présenter aux cellules T un antigène , qu'il soit soluble ou sous forme particulaire . Par contre, les lymphocytes B sont incapables de présenter un antigène rendu particulaire par couplage à des billes d'une taille de l'ordre du micron.

2.4 Induction de réponses T prolifératives par injection à des souris de lysozyme couplé aux microparticules.

L'immunogénicité in vivo de l'antigène couplé aux microparticules a été analysée en immunisant des souris BALB/c avec du lysozyme en adjuvant complet de Freund ou avec cet antigène couplé à des billes de polyacroléine . Après 14 jours, les cellules des ganglions drainants de ces animaux ont

été stimulées in vitro par différentes concentrations de lysozyme soluble.

En présence de lysozyme soluble, les cellules ganglionnaires prolifèrent fortement, qu'elles proviennent de
5 souris immunisées avec le lysozyme soluble ou avec des microparticules-lysozyme (figure 6A) . Ceci démontre que dans les deux cas, des cellules T spécifiques du lysozyme ont été sensibilisées in vivo . Après injection à des souris de microparticules-LH représentant le contrôle de spécificité,
10 les cellules ganglionnaires de ces animaux sont incapables de proliférer en réponse à une stimulation par le lysozyme soluble in vitro (figure 6B). La réponse cellulaire in vitro est donc spécifique de l'antigène protéique couplé aux microparticules, utilisé lors de l'immunisation des souris.

15 La réponse proliférative des cellules sensibilisées par 109 microparticules-lysozyme (correspondant à 1 μ g de lysozyme) en absence d'adjuvant , est aussi élevée que celle des cellules d'animaux immunisés par 100 μ g de lysozyme soluble en adjuvant de Freund (CFA) (figure 6A). Pour
20 vérifier et préciser ce résultat, les réponses prolifératives des cellules ganglionnaires d'animaux ayant reçu différentes doses de lysozyme en CFA ou différentes concentrations de microparticules couplées ont été comparées, après stimulation in vitro par le lysozyme soluble .

25 Dans le cas des Figures 7A et 7B, des souris ont été immunisées par injection sous-cutanée à la base de la queue avec du lysozyme soluble et de l'adjuvant complet de Freund (CFA) (Figure 7A) ou des billes couplées à l'antigène sans
aucun adjuvant (Figure 7B).

30 Après 14 jours, les ganglions inguinaux ont été prélevés, et la réponse proliférative de ces cellules a été testées in vitro contre différentes concentrations de lysozyme. Les résultats sont exprimés en cpm corrigés de la valeur obtenue sans antigène.

35 Sur la Figure 7B, il est à noter que les dénominations

10^9 , 10^8 , 10^7 et 10^6 B-LYSO correspondant respectivement à des poids de 1; 0,1; 0,01 et 0,001 μg en lysozyme.

Ces résultats démontrent que les cellules ganglionnaires des animaux immunisés avec des microparticules portant du lysozyme prolifèrent in vitro après mise en contact avec le lysozyme, indiquant ainsi une sensibilisation des cellules T spécifiques de cet antigène.

La comparaison des effets doses (Figure 7) indique que 1 μg de lysozyme couplé aux billes donne une réponse quasi-équivalente à celle de 1 μg d'antigène injecté en CFA.

La figure 8 représente la réponse proliférative des cellules de souris immunisées par le lysozyme en adjuvant complet de Freund (CFA) ou en PBS avec des microparticules couplées au LH. L'addition de billes LH au lysozyme ne permet pas d'induire des réponses prolifératives élevées ce qui indique que le lysozyme doit être couplé de façon covalente aux microparticules pour induire des réponses T prolifératives.

EXEMPLE 3.

Induction de réponse anticorps par des microparticules portant un antigène.

Les matériels et méthodes sont similaires à ceux de l'Exemple 2.

Pour les Figures 9A et 9B, des souris BALB/c ont été immunisées par injection intra-péritonéale avec 100 μg de lysozyme soluble en adjuvant (alum) ou avec les billes couplées à l'antigène: lysozyme ou Hémocyanine de Lumulus (LH), sans aucun adjuvant.

Les injections ont été faites à J0, J21, J42, les sérums ont été prélevés à J20, J31 (1er rappel + 10) J40 et J52 (2ème rappel); et testés en ELISA pour leur teneur en anticorps. Les résultats sont exprimés en \log_{10} du titre en anticorps anti-lysozyme (Figure 9A) et anti-LH (Figure 9B).

Trois injections d'antigène ont été faites i.p. aux jours 0, 21 et 42. Les microparticules-lysozyme donnent de

très bonnes réponses anticorps alors qu'aucune réponse anticorps n'est induite par les microparticules LH. Ces microparticules, par ailleurs, stimulent de façon très efficace les réponses T.

5 Une des différences entre le LH et le lysozyme réside dans leurs poids moléculaire (14500 pour lysozyme et 71000 pour LH).

10 A concentrations d'antigène couplé égales, la densité des molécules de LH sur les billes est donc environ 5 fois plus faible. Ceci pourrait expliquer l'absence de stimulation des réponses anticorps si celles-ci sont dues à la stimulation directe T-indépendante par l'antigène présent à forte densité sur les microparticules.

EXEMPLE 4

15 Effet de la densité en lysozyme à la surface de microparticules sur leur immunogénéicité

Les matériels et méthodes utilisés sont similaires à ceux de l'Exemple 2.

20 L'immunogénéicité des billes couplées avec du lysozyme et présentant un nombre de molécules variables à leur surface a été testée dans les expériences présentées Figures 10 et 11.

25 Pour la Figure 10A, des souris BALB/c ont été immunisées par injection sous-cutanée avec 100 µg de lysozyme en CFA. Après 14 jours les ganglions inguinaux ont été prélevés et les cellules testées in vitro contre les billes portant différentes densités de lysozyme (de 1100 à 950.000 molécules de lysozyme ramenées à des billes de 1 µm de diamètre). Les résultats sont exprimés en cpm corrigés de la valeur obtenue sans antigène.

30 Pour la Figure 10B, des souris BALB/c ont été immunisées par injection sous-cutanée à la base de la queue avec du lysozyme soluble avec adjuvant (CFA) ou 10^9 billes portant différentes densités de lysozyme sans aucun adjuvant.

35 Après 14 jours, les ganglions inguinaux ont été prélevés, et la réponse proliférative de ces cellules a été

testée in vitro contre différentes concentrations de lysozyme ou billes. Les résultats sont exprimés en cpm corrigés de la valeur obtenue sans antigène.

La prolifération des cellules ganglionnaires provenant d'animaux immunisés par le lysozyme soluble en CFA a été testée après stimulation in vitro par les différentes microparticules-lysozyme. La réponse proliférative de ces cellules étant d'autant plus forte que la densité du lysozyme en surface des microparticules est élevée. Aucune prolifération des cellules ganglionnaires n'est obtenue après stimulation par les microparticules présentant une densité de 1.100 molécules de lysozyme par microparticule (figure 10A).

Dans l'expérience de la figure 10B, l'immunogénicité de ces microparticules a été testée in vivo. Des souris BALB/c ont été immunisées par les différentes microparticules, sans adjuvant, et les cellules ganglionnaires de ces animaux ont été stimulées in vitro par différentes concentrations de lysozyme soluble.

La prolifération des cellules ganglionnaires provenant d'animaux immunisés par les microparticules couplées au lysozyme à forte densité (950.000 et 210.000) est élevée, et comparable à la réponse des cellules sensibilisées par 100 µg de lysozyme en CFA. Après immunisation par les microparticules portant une densité moyenne de lysozyme (45.000), les cellules prolifèrent en réponse au lysozyme in vitro à partir de 10^{-1} µg/ml. Les microparticules de plus faible densité n'ont pas sensibilisé les cellules T in vivo, car aucune prolifération n'a été observée en présence de lysozyme même à concentration élevée (figure 10B).

Il est à noter que 10^9 microparticules couplées avec le lysozyme à haute densité correspondent à 23µg (1-950.000-G) et 5 µg (1-210.000-G) de lysozyme couplé, cependant la prolifération des cellules est aussi élevée qu'après injection de 100 µg de lysozyme en CFA.

Pour la Figure 11, des souris BALB/c ont été

immunisées par injection sous-cutanée de lysozyme avec adjuvant (CFA) ou avec 10^9 microparticules portant différentes densités de lysozyme (950.000; 210.000, 45.000 et 1100 molécules respectivement, ramenées à une microparticule de 1
5 μm de diamètre).

Après 14 jours, les sérums ont été prélevés et testés en ELISA pour leur teneur en anticorps anti-lysozyme. Les résultats sont exprimés en \log_{10} du titre en anticorps.

La réponse humorale des souris immunisées par ces
10 microparticules présentant différentes densités de lysozyme a été étudiée. L'injection de 100 μg de lysozyme en CFA induit un taux élevé d'anticorps anti-lysozyme (figure 11). Quatorze jours après l'immunisation, les billes couplées à la plus forte densité de lysozyme (950.000) ont induit une
15 production d'anticorps significative, alors que les billes de densité inférieure n'ont pas stimulé l'induction de réponse anticorps anti-lysozyme significative. Il faut noter, en particulier, que les billes de densité 210.000 qui ont induit une excellente prolifération spécifique du lysozyme n'ont pas
20 stimulé la production d'anticorps.

Ces résultats révèlent que la prolifération de cellules T est induite avec des densités de lysozyme allant de 45.000 à 950.000 molécules de lysozyme par microparticule, alors que la production d'anticorps nécessite une densité importante de
25 protéine couplée aux microparticules.

Au sens de la présente description, l'expression "microparticules" désigne des particules pouvant avoir diverses configurations géométriques et spatiales. Dans la pratique, il s'agit préférentiellement de microsphères ou
30 billes, telles qu'elles sont obtenues par les techniques usuelles de fabrication des polymères.

REVENDICATIONS

1. Utilisation de microparticules en matériau synthétique polymère, portant en surface une ou plusieurs protéines liées de manière covalente, la ou lesdites protéines portant chacune un ou plusieurs épitopes, pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin pour l'induction d'une réponse immunitaire, les densités de la ou des protéines à la surface des microparticules étant ajustées afin d'orienter ladite réponse immunitaire, vers l'induction d'une réponse humorale et cellulaire ou vers l'induction d'une réponse majoritairement cellulaire.
2. Utilisation selon la revendication 1, pour l'induction de réponses cellulaire et/ou humorale, caractérisée en ce que les microparticules présentent une densité pour chacune des protéines portant un épitope d'au minimum 10^5 molécules/ μm^2 et préférentiellement $5 \cdot 10^5$ protéines/ μm^2 .
3. Utilisation selon la revendication 1, pour l'induction d'une réponse majoritairement cellulaire, caractérisée en ce que les microparticules présentent une densité pour chacune des protéines portant un épitope, comprise environ entre 10^4 et $5 \cdot 10^4$ molécules/ μm^2 .
4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les microparticules ont un diamètre moyen compris entre environ 0,75 et environ 1,5 μm , et préférentiellement de 1 μm .
5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la liaison est effectuée par réaction des fonctions NH_2 et/ou CO des protéines et du matériau constituant la microparticule.
6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la liaison des protéines et du matériau constituant la microparticule est covalente et est effectuée par l'intermédiaire d'un agent pontant.
7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée

en ce que l'agent pontant est le glutaraldéhyde ou le carbodiimide.

5 8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ledit matériau est un polymère biocompatible.

9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisé en ce que ledit polymère est le polyacroléine ou le polystyrène ou des polymères d'acide lactique ou des copolymères d'acides lactique et glycolique .

10 10. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 9, pour la fabrication d'un médicament pour la thérapeutique humaine, caractérisée en ce que ledit polymère est biodégradable.

15 11. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que les microparticules portent en surface des molécules susceptibles d'activer le système immunitaire.

20 12. Procédé pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin dont la réponse immunitaire est soit majoritairement humorale soit majoritairement cellulaire, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'on fixe de manière covalente sur des microparticules en matériau synthétique polymère au moins une protéine portant un ou plusieurs épitopes ou des peptides contenant uniquement des épitopes T ou B ou une composition des deux en faisant varier la densité de la protéine fixée à
25 la surface selon le type de réponse désirée.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'on utilise des microparticules comme indiqué à l'une quelconque des revendications 1 à 11.

30 14. Microparticule en un matériau synthétique polymère portant en surface une ou plusieurs protéines liées de manière covalente au matériau constituant la microparticule, la ou lesdites protéines portant chacune un ou plusieurs épitopes, et étant présentes à des densités comprises entre 10^4 et $5.10.5$ protéines/ μm^2 pour chacune des protéines.

35 15. Microparticule selon la revendication 14,

caractérisée en ce qu'elle a un diamètre moyen compris entre environ 0,25 μm et 1,5 μm , et préférentiellement de 1 μm .

5 16. Microparticule selon l'une des revendications 14 et 15, caractérisée en ce que la liaison est effectuée par réaction des fonctions NH_2 et/ou CO des protéines et du matériau constituant la microparticule.

10 17. Microparticule selon l'une des revendications 14 et 15, caractérisée en ce que la liaison des protéines et du matériau constituant la microparticule est effectuée par l'intermédiaire d'un agent pontant.

18. Microparticule selon la revendication 17, caractérisée en ce que l'agent pontant est le glutaraldéhyde, ou le carbodiimide.

15 19. Microparticule selon l'une des revendications 14 à 18, caractérisée en ce qu'elle est composée d'un polymère biocompatible.

20 20. Microparticule selon la revendication 19, caractérisée en ce que ledit polymère est la poly(acroléine) ou le polystyrène, un polymère d'acide lactique ou un copolymère d'acide lactique et glycolique.

21. Microparticule selon la revendication 19, pour l'application en thérapeutique humaine, caractérisée en ce que ledit polymère est biodégradable.

25 22. Microparticule selon l'une des revendications 14 à 21, caractérisée en ce qu'elle porte en surface des molécules susceptibles d'activer le système immunitaire.

30 23. Microparticule selon l'une des revendications 14 à 22, caractérisée en ce que ladite protéine comprend l'épitope B de la région pré- s_2 de l'antigène HBS du virus de l'hépatite virale.

24. Microparticule selon l'une des revendications 14 à 22, caractérisée en ce que ladite protéine comprend l'épitope B de la protéine VP1 du virus de la poliomyélite.

35 25. Microparticule selon l'une des revendications 14 à 22, caractérisée en ce que ladite protéine comprend l'épitope

B de la protéine gp 120 du virus HIV-1.

26. Médicament ou vaccin, caractérisé en ce qu'il comprend des microparticules selon l'une des revendications 14 à 25.

- 5 27. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend des microparticules selon l'une des revendications 14 à 25 en association avec des diluants et adjuvants pharmaceutiquement compatibles.

1/10

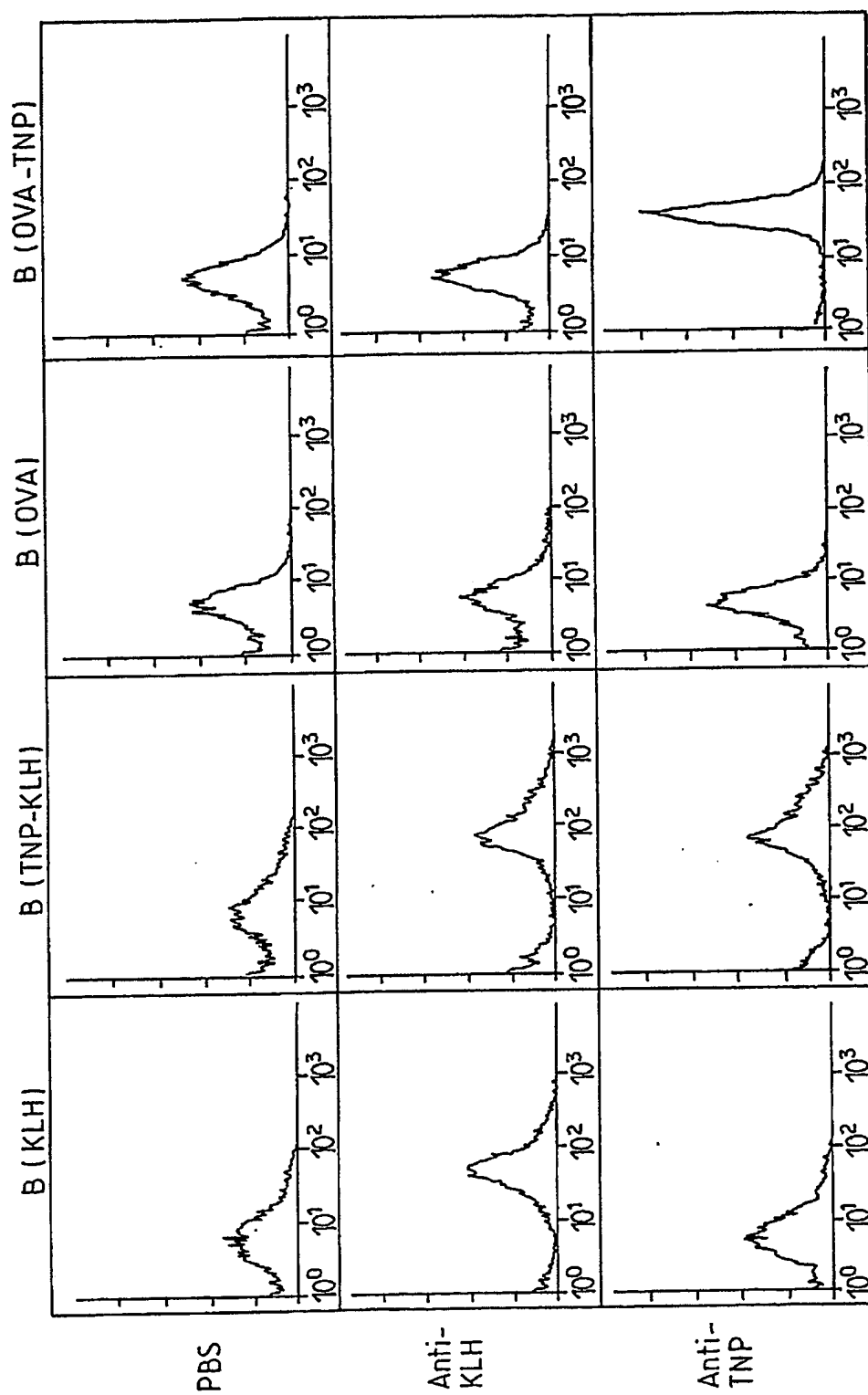
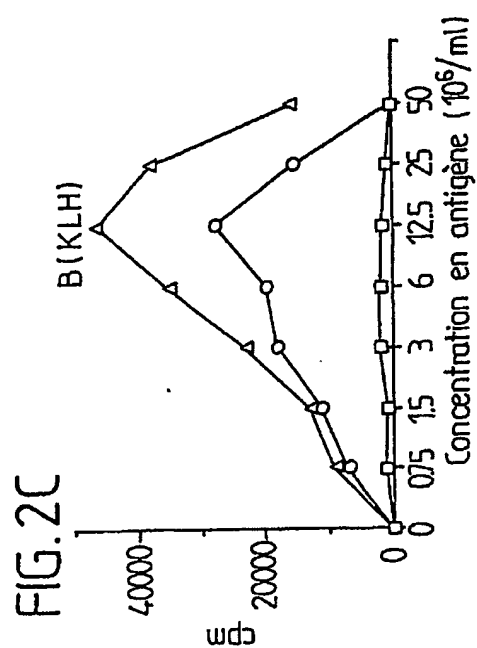
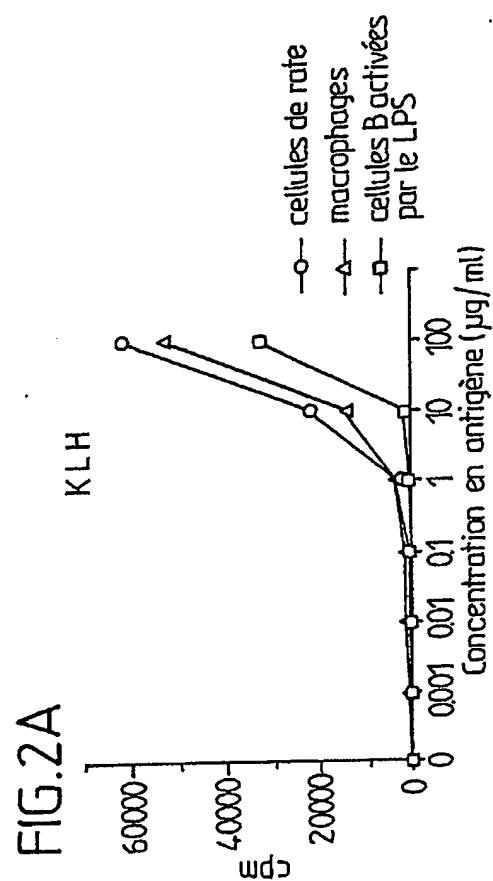
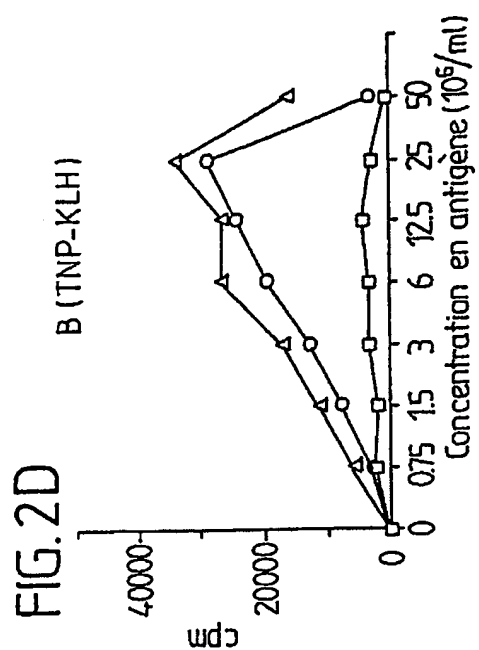
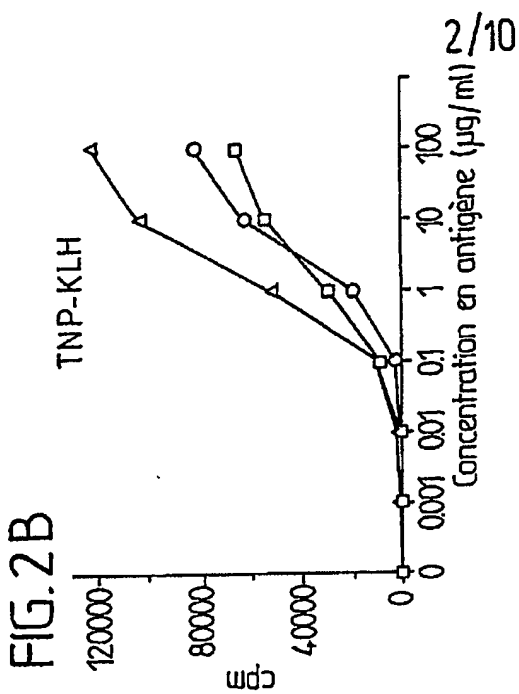


FIG.1



3/10

FIG. 3A

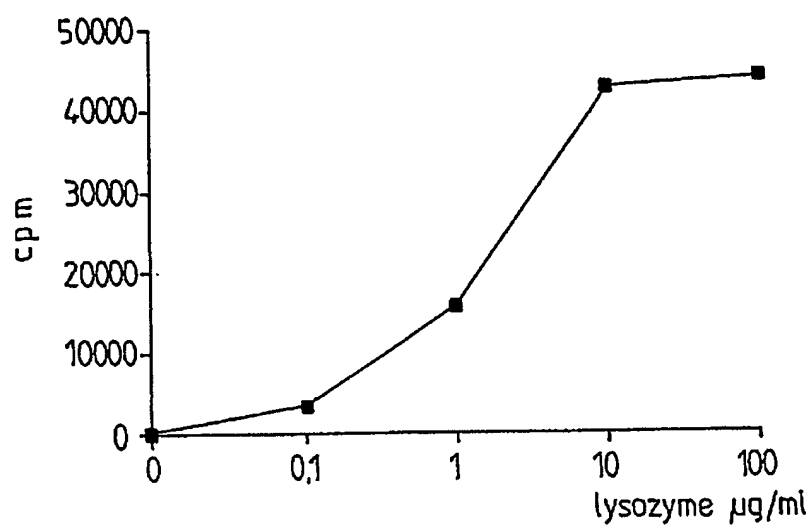
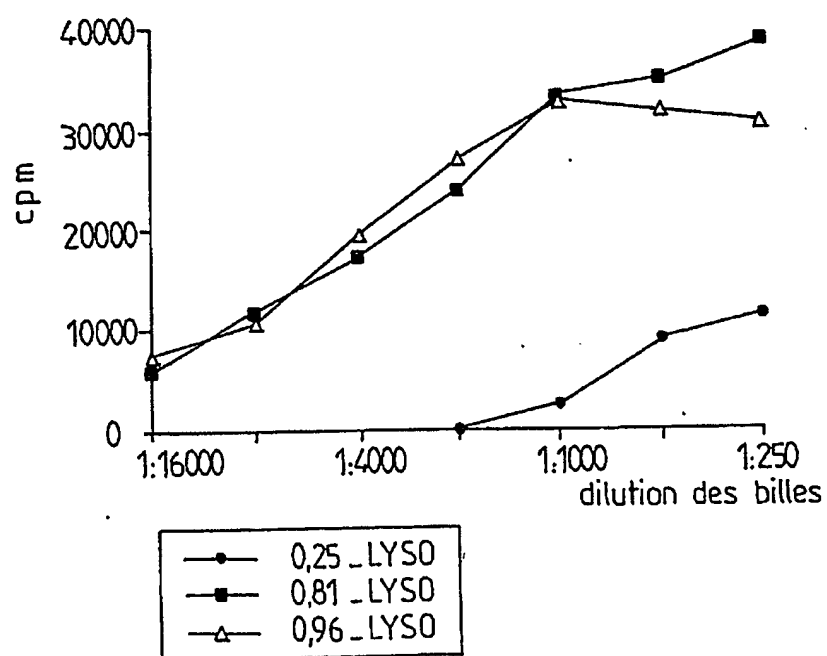


FIG. 3B



4/10

FIG. 4A

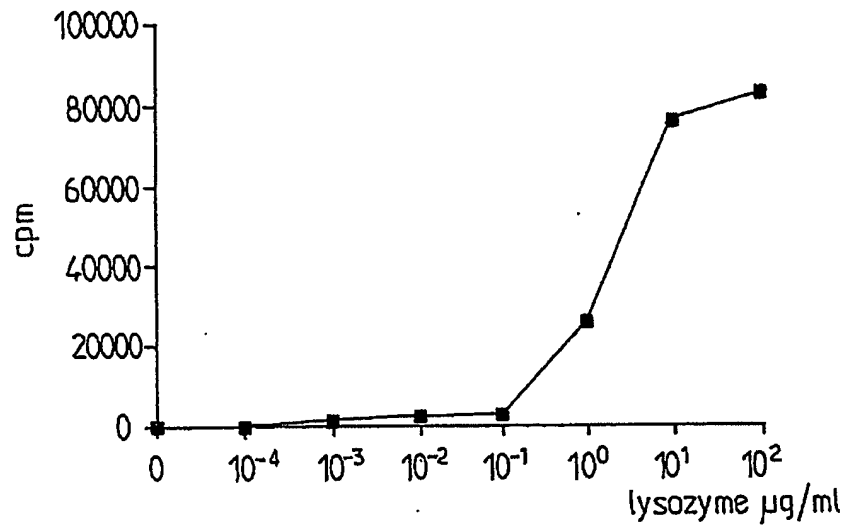
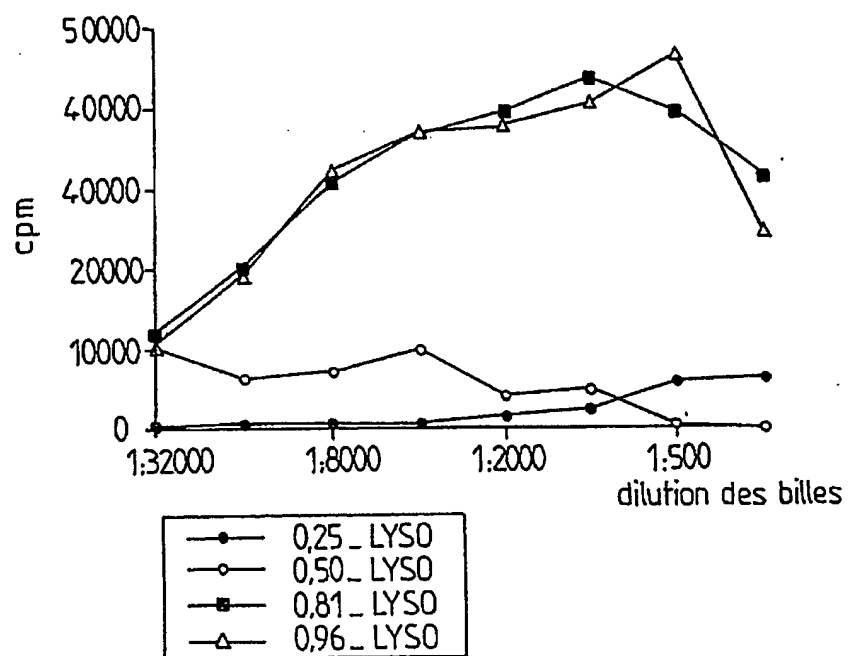


FIG. 4B



5/10

FIG. 5A

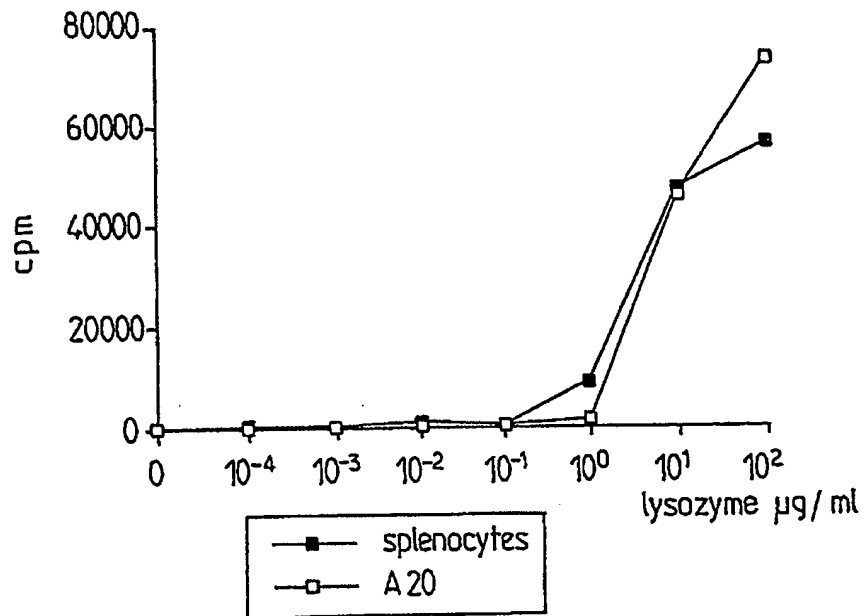
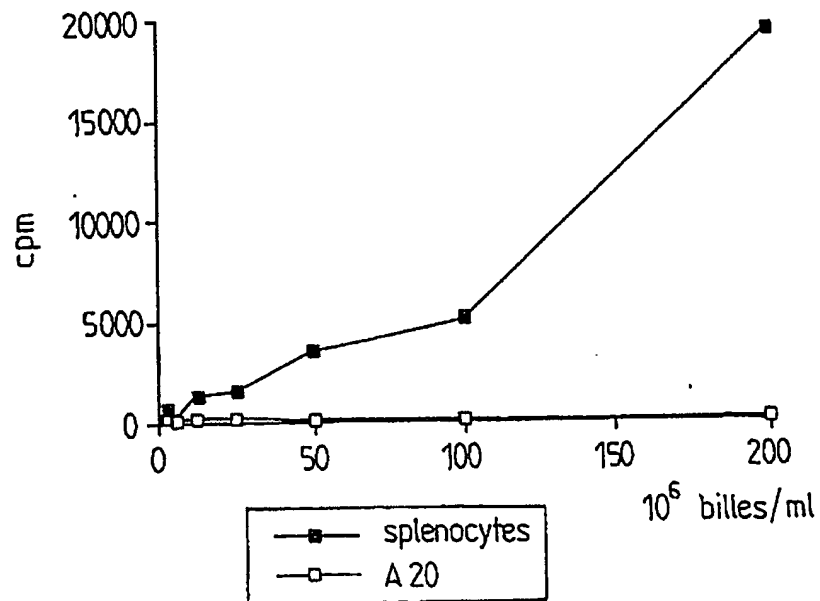


FIG. 5B



6/10

FIG. 6A

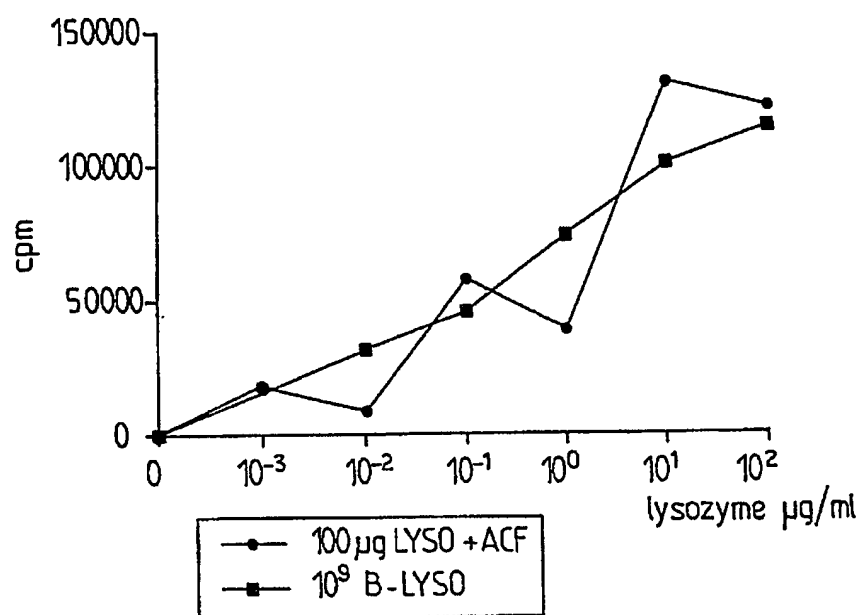
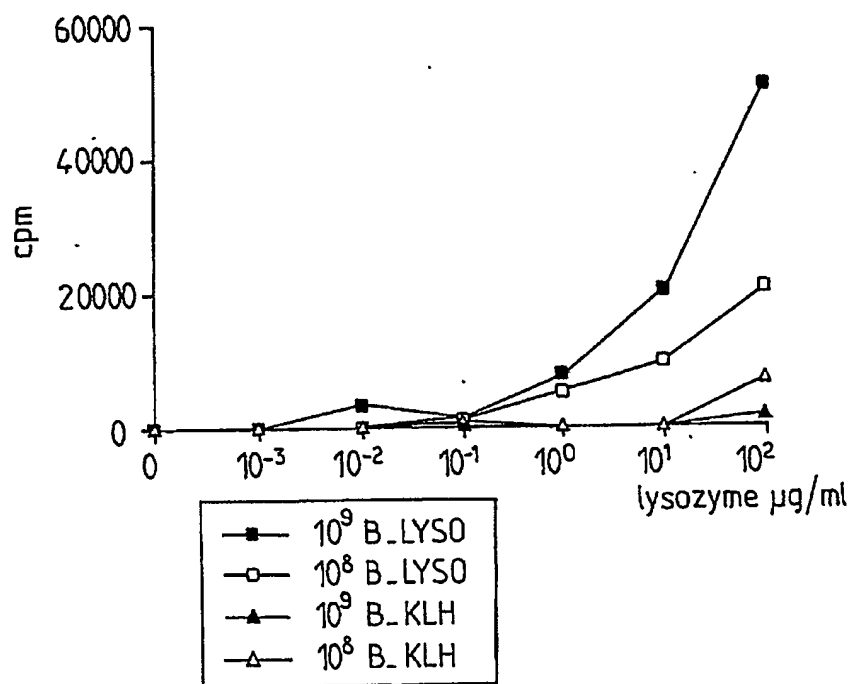


FIG. 6B



7/10

FIG. 7A

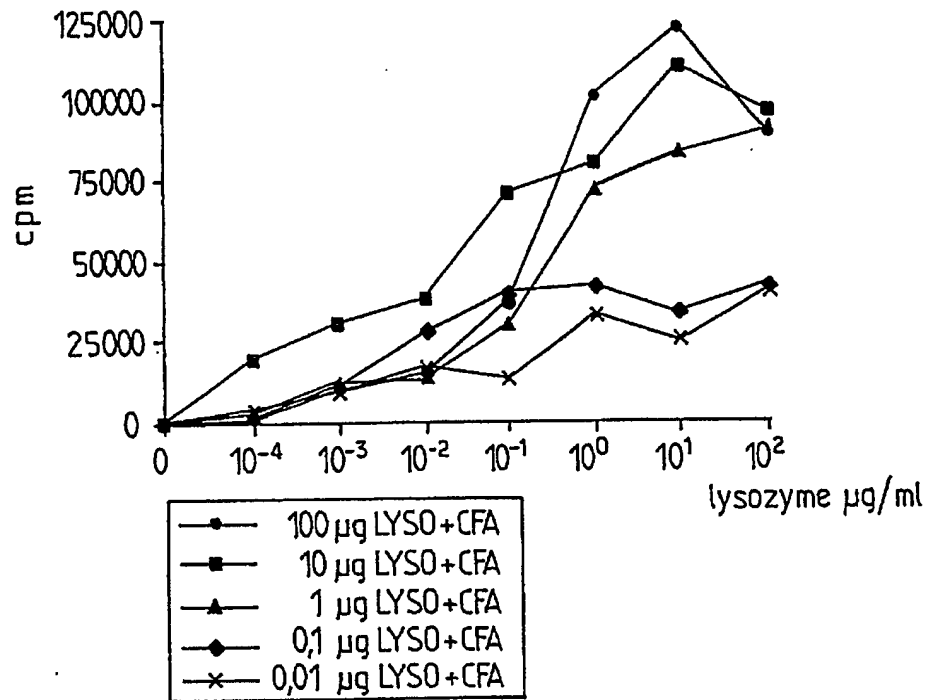
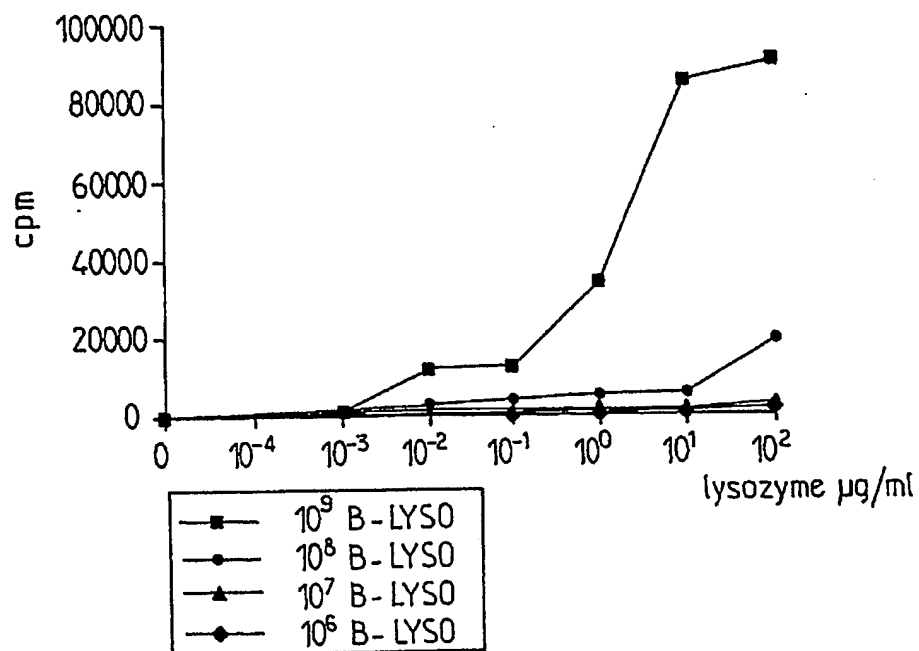


FIG. 7B



8/10

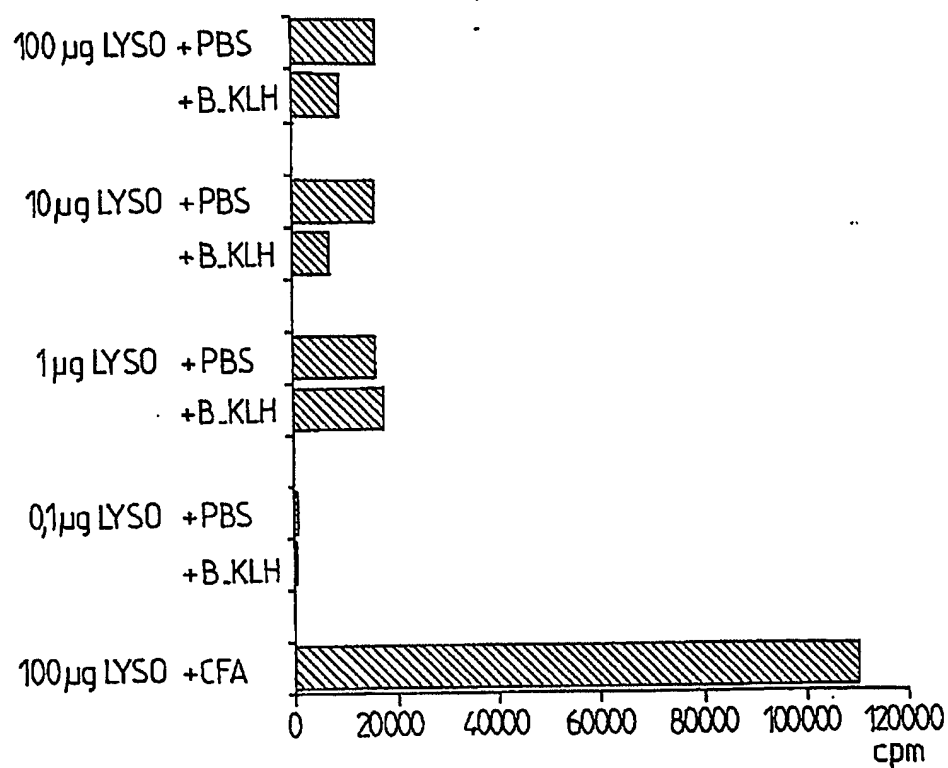


FIG. 8

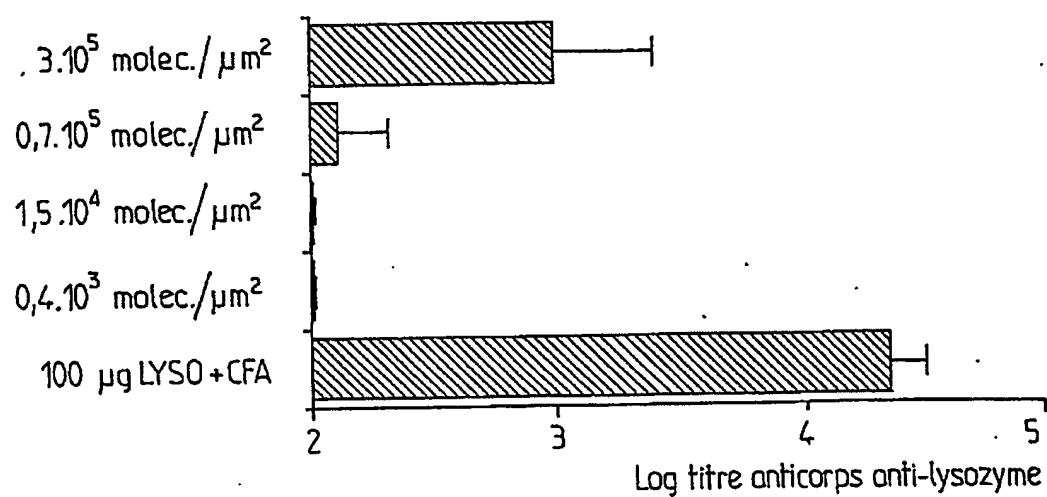


FIG. 11

9/10

FIG. 9A

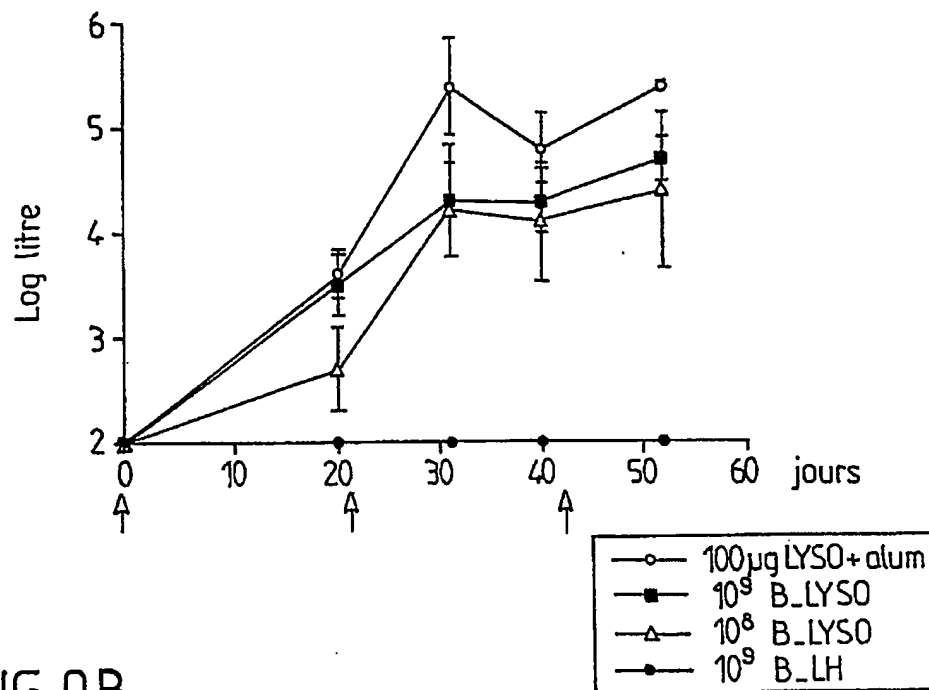
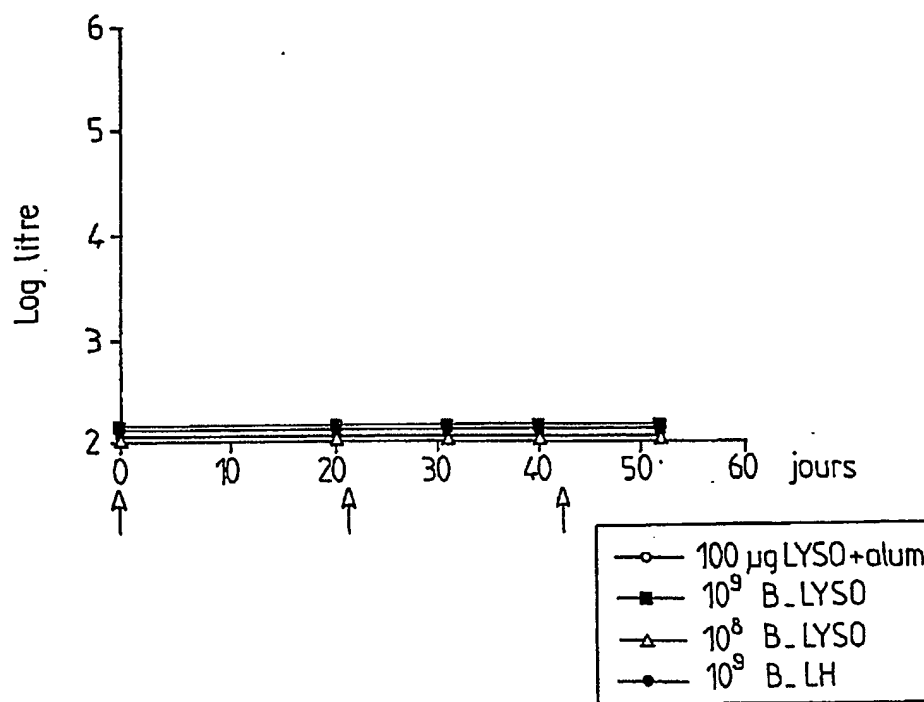


FIG. 9B



10/10

FIG.10 A

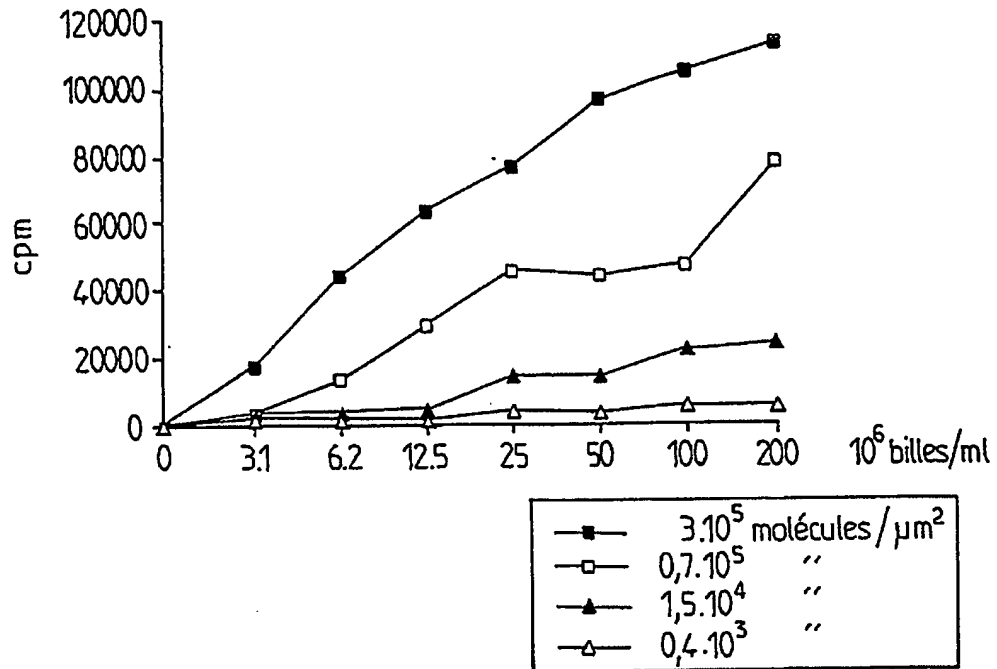
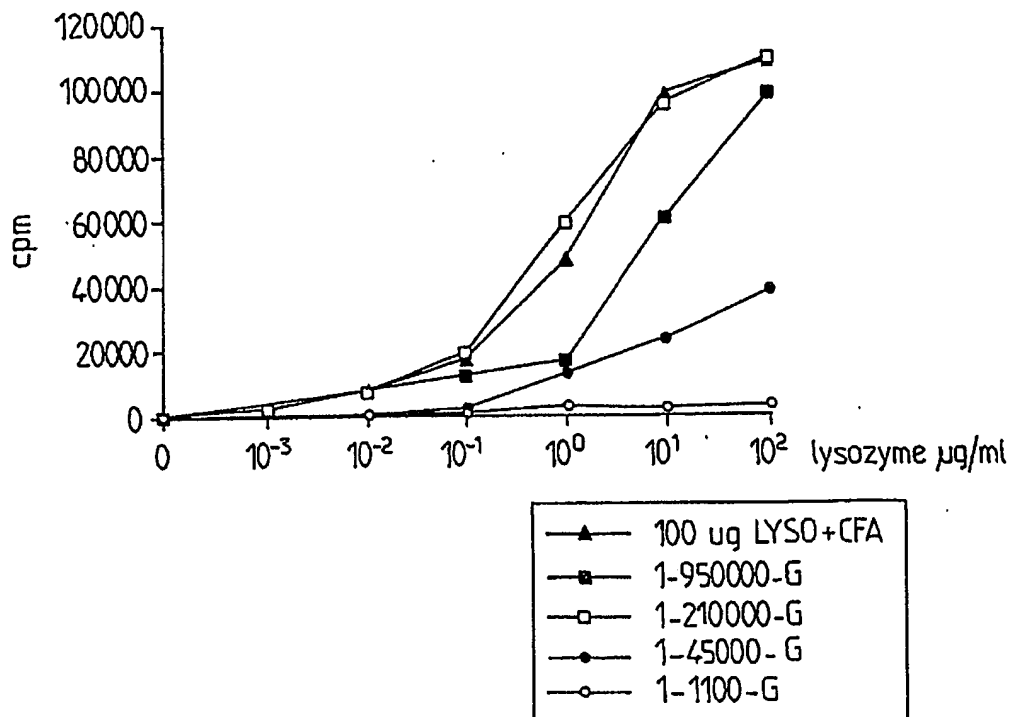


FIG.10 B



REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

25 JUIN 1993

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2695563

N° d'enregistrement
national

FR 9210879
FA 477022

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X,D	JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS vol. 52, no. 3, 1982, pages 341 - 351 A. REMBAUM ET AL. 'CELL LABELING AND MAGNETIC SEPARATION BY MEANS OF IMMUNOREAGENTS BASED ON POLYACROLEIN MICROSPHERES' * page 342, ligne 30 - page 343, ligne 31 *	14
X,D	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY vol. 17, Septembre 1987, pages 1287 - 1296 H. KIRK ZIEGLER ET AL. 'DIFFERENTIAL REQUIREMENTS FOR THE PROCESSING AND PRESENTATION OF SOLUBLE AND PARTICULATE BACTERIAL ANTIGENS BY MACROPHAGES.' L'article en entier.	14-16, 19-22
A	EP-A-0 465 081 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA)	
A	FR-A-2 304 326 (KREUTER JÖRG ET AL)	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C07K A61K
Date d'achèvement de la recherche 09 JUIN 1993		Examinateur REMPP G.L.E.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 1503 (04/12)

① RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 695 563

② N° d'enregistrement national :

92 10879

⑤ Int Cl⁸ : A 61 K 39/385, 47/48

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

② Date de dépôt : 11.09.92.

③ Priorité :

⑦ Demandeur(s) : INSTITUT PASTEUR — FR.

⑧ Inventeur(s) : Gengoux Christine et Leclerc Claude.

④ Date de la mise à disposition du public de la
demande : 18.03.94 Bulletin 94/11.

⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦ Titulaire(s) :

⑧ Mandataire : Cabinet Harlé & Phélip.

⑤ Microparticules portant des antigènes et leur utilisation pour l'induction de réponses humorales ou cellulaires.

⑦ Utilisation pour l'induction d'une réponse immunitaire de microparticules en matériau synthétique polymère portant en surface une ou plusieurs protéines liées de manière covalente pouvant porter un ou plusieurs épitopes, les densités de la ou des protéines à la surface des microparticules étant ajustées afin d'orienter la réponse immunitaire vers l'induction d'une réponse humorale et cellulaire ou vers l'induction d'une réponse majoritairement cellulaire.

Les microparticules ont un diamètre moyen compris entre environ 0,75 et environ 1,5 μm .

FR 2 695 563 - A1



La présente invention a pour objet des microparticules portant en surface des antigènes et leur utilisation pour l'induction de réponses humorales ou cellulaires.

Plus spécifiquement, l'invention concerne également des microparticules comportant, en surface, une densité importante d'antigènes.

Les cellules B qui expriment des récepteurs immunoglobulines spécifiques pour un antigène particulier sont hautement efficaces pour la présentation de cet antigène. (Rock et al. C., J.Exp. Med. (1984) 160; 1102; Hutchings et al. Eur. J. Immunol. (1987) 17:393). Par exemple, des cellules B spécifiques peuvent présenter la toxoïde tétanique à des cellules T à des concentrations en antigène 10^4 inférieures à celles requises pour la présentation par des cellules B non spécifiques ou des monocytes du sang périphérique. (Lanzavecchia, Nature, (1985) 314:537).

De plus, des études in vivo avec des souris déficientes en cellules B indiquent que ces cellules sont requises pour l'activation des cellules T des ganglions lymphatiques (Janeway et al. J. Immunol. (1987) 138:1051; Ron, et al. J., J. Immunol. (1987) 138:2848; Kurt-Jones et al. A.K. J. Immunol. (1987) 140:3773).

Les souris déficientes en cellules B présentent aussi des réponses réduites en ce qui concerne les cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ spécifiques de tumeurs, après immunisation par le virus de la leucémie murine de Freund (Schultz et al., Science, (1990) 291).

La capacité des cellules B à modifier et à présenter l'antigène en vue de la reconnaissance par des cellules T Helper $CD4^+$ restreintes au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC) forme la base d'un modèle d'activation des cellules B par les cellules T. (Noëlle et al. The FASEB Journal. (1991) 5:2770).

La reconnaissance par des cellules T Helper $CD4^+$ du complexe peptide-MHC de classe II à la surface des cellules B

permet la formation de conjugués stables physiquement entre les cellules T et les cellules B (Kupfer et al. S.J. Proc. National Acad. Sci. USA. (1986) 83:6080).

5 Cette reconnaissance directe a pour résultat la prolifération et la différenciation de cellules B en réponse à des lymphokines telles l'Interleukine-2, l'Interleukine-4 ou l'Interleukine-5.

10 L'induction de la réponse anticorps contre un antigène nécessite donc la présentation de l'antigène par des cellules B.

La plupart des études sur la présentation de l'antigène ont été effectuées en utilisant des protéines solubles telles que la toxoïde du tétanos, le lysozyme, l'hémocyanine (LH). Cependant, la plupart des antigènes auxquels le système
15 immunitaire est exposé, sont inclus dans des structures particulières complexes telles que des bactéries ou des parasites.

Il est bien établi que les cellules qui sont capables de phagocytose telles que les macrophages peuvent présenter
20 des antigènes bactériens à des cellules T.

Par contre, on ne sait pas si des cellules qui ne phagocytent pas, telles que les cellules B, peuvent présenter des antigènes complexes et de tailles importantes.

Il a été montré récemment que, in vivo, des antigènes
25 bactériens devaient être mis sous une forme soluble, pour induire une réponse anticorps dépendante des cellules T (Leclerc et al. J. Immunol. (1990) 144:3174; Leclerc et al. J. Immunol. (1991) 147:3545).

Il convenait cependant d'établir encore qu'in vivo, les
30 antigènes protéiques bactériens sont exclusivement présentés aux cellules T par des cellules phagocytaires et que les cellules B ne peuvent modifier des antigènes sous forme de particules.

A cet effet, on a comparé, selon la présente invention,
35 la capacité de macrophages et de cellules B à présenter le

même antigène, sous une forme soluble et particulière.

On a notamment utilisé des antigènes protéiques ,tels que le lysozyme et le TNP-LH, couplés à des microparticules de poly(acroléine) ou de polystyrène ayant une taille comparable
5 à celle d'une bactérie .

Selon l'invention, on a montré de manière surprenante que les cellules B qui présentent le TNP-LH ou le lysozyme de manière très efficace, sont incapables de présenter ces antigènes couplés à des billes. Par contre, les macrophages
10 présentent les deux formes d'antigènes aux cellules T.

L'étude de la présentation des antigènes et de l'induction de la réponse T cellulaire et/ou humorale a une importante scientifique et médicale particulière.

En effet, l'orientation vers une réponse purement
15 cellulaire ou une réponse purement humorale peut permettre de vacciner contre certains pathogènes, de modifier certains dysfonctionnements biologiques et de guérir certaines pathologies.

Par exemple, une telle orientation permettrait
20 d'éliminer des infections persistantes ou d'opérer une régulation des réponses allergiques .

De plus, il existe deux sous-populations de cellules T, CD4⁺, les Th1 et les Th2 qui ont des capacités différentes à produire diverses lymphokines (Mosmann , Cherwinski, Bond ,
25 Giedlin et Coffman, J. Immunol., 136, 2348-2357 (1986)) . L'induction de Th1 ou de Th2 joue un rôle majeur dans la résistance aux infections bactériennes, parasitaires ou virales . Ainsi, dans le cas de la leishmaniose cutanée murine, les Th1 protègent de l'infection alors que les Th2
30 aggravent la maladie . In vitro , les lymphocytes B stimulent de façon optimale la prolifération des clones Th2 alors qu'une forte prolifération des clones Th1 est observée avec les cellules adhérentes (Gajewski, Pinna, Wong et Fitch . J. Immunol., 146, 1750-1758 (1991)) .

35 L'orientation de l'antigène vers la présentation par

des cellules B ou des macrophages peut permettre d'induire des réponses Th1 ou Th2.

Différentes techniques ont été développées jusqu'à présent pour induire une meilleure réponse immunitaire.

5 La plus ancienne des méthodes consiste à activer le système immunitaire à l'aide d'adjuvants. Ainsi, l'adjuvant de Freund permet d'augmenter l'intensité des réponses humorale et cellulaire . Cependant, de tels adjuvants présentent des inconvénients majeurs dus à leur manque de spécificité, à leur
10 toxicité et aux réactions immunologiques parasites qu'ils risquent d'induire, en raison de leur manque de pureté.

Les iscomes (abréviation de l'expression immuno-stimulating complexes) sont composés d'un complexe antigénique et d'un adjuvant, le QuilA qui est extrait d'un arbre. Ces
15 particules ont un diamètre d'environ 35 nm et sont composées de sous-unités d'environ 12nm. Elles permettent d'induire une réponse immunologique mais le plus souvent les antigènes sont encapsulés et sont donc ensuite relargués dans le milieu extérieur. En outre, la technique ne permet pas un contrôle
20 précis du type de cellules présentant ces particules, et de ce fait ces particules induisent une double réponse humorale et cellulaire.

Enfin, du point de vue pratique, on notera des difficultés de préparation, un manque de stabilité et une
25 toxicité importante de ces particules.

Les liposomes dont l'utilisation a aussi été testée pour l'induction d'une réponse immunitaire présentent les mêmes inconvénients que les iscomes.

Des microparticules biodégradables comme par exemple
30 des polymères d'acide lactique et glutamique ont aussi été développées (Aguado et Lambert, Immuno. Biol., 184, 113-125, (1992)). Ces microparticules libèrent au cours de leur dégradation , l'antigène sous forme soluble. Cette libération permet une présentation de l'antigène par diverses cellules et
35 l'induction d'une réponse humorale sans possibilité

d'orientation vers une réponse spécifiquement cellulaire.

Des particules constituées exclusivement de protéines recombinantes ont aussi été synthétisées. Ainsi, la demande de brevet français FR 2.635.532 décrit des particules composées d'une protéine hybride entre l'antigène HBs et une séquence immunogène supposée induire des anticorps neutralisants dirigés contre des virus HIV.

Des particules contenant la toxine de la poliomyélite ont aussi été fabriquées.

Ces particules présentent des inconvénients notables. Ainsi, il est très difficile d'insérer des séquences longues dans ces particules. De plus, elles induisent tant une réponse humorale que cellulaire et il n'est donc pas possible d'obtenir spécifiquement l'une des deux.

De plus, dans l'ensemble de ces travaux, le critère de la taille des particules n'a jamais été considéré comme critique . Cependant , des particules de petites tailles (nanoparticules) comme les particules HBs pourraient être présentées par les lymphocytes B. Au contraire, des particules de taille trop importantes (supérieures à 5-10 microns) ne peuvent pas être présentées par des cellules phagocytaires.

Les diverses solutions proposées dans l'état de la technique d'une part pour permettre une induction d'une réponse immunologique importante et d'autre part pour diriger cette réponse spécifiquement dans une des deux voies de réponse, humorale ou cellulaire, ne sont donc pas satisfaisantes.

L'invention propose de mettre au point des produits permettant d'obtenir une bonne réponse immunologique tout en ayant une orientation cellulaire ou humorale.

Selon l'invention, on a trouvé de manière surprenante qu'une telle réponse pouvait être induite à l'aide de microparticules , de faibles tailles et présentant des densités antigéniques variées.

La présente invention a particulièrement pour objet des

microparticules en matériau synthétique polymère portant en surface une ou plusieurs protéines liées de manière covalente au matériau constituant les microparticules, la ou lesdites protéines portant chacune un ou plusieurs épitopes et étant
5 présentes à une densité comprise entre 10^4 et 5.10^5 molécules/ μm^2 pour chacune des protéines.

L'invention concerne aussi les caractéristiques ci-après, considérées isolément ou selon toutes leurs combinaisons techniquement possibles:

10 Le couplage des protéines antigéniques ou microparticules doit être covalent pour éviter la libération sous forme soluble de l'antigène.

Les microparticules ont avantageusement un diamètre moyen compris environ entre $0,75 \mu\text{m}$ et $1,5 \mu\text{m}$, et
15 préférentiellement d'environ $1 \mu\text{m}$ afin de pouvoir être présentées aux lymphocytes T, CD4^+ par des cellules phagocytaires mais pas par des lymphocytes B .

Lesdites microparticules sont plus particulièrement caractérisées en ce que la liaison covalente est réalisée par
20 réaction des fonctions NH_2 et/ou CO des protéines et du matériau constituant la microparticule.

Avantageusement une telle liaison se fera par l'intermédiaire d'un agent pontant, tel que par exemple le glutaraldéhyde ou le carbodiimide. Néanmoins, tout autre agent
25 bifonctionnel permettant une telle liaison peut être utilisé. De tels agents sont connus, voir par exemple Synthetic polypeptides as antigens , M.H. Von Regenmortel, J.P. Briand, S. Muller and S.Plane 1988 (Elsevier).

Le matériau constituant la microparticule est
30 avantageusement un polymère biocompatible, tel qu'un polymère acrylique, par exemple la polyacroléine ou le polystyrène ou des poly(alpha-acides hydroxyques), des copolymères d'acides lactiques et glycoliques , ou des polymères d'acides lactiques.

35 On entend par polymère tout homopolymère ou hétéro- ou

copolymère.

Il doit permettre un couplage covalent des protéines au matériau et ne doit pas entraîner de réaction de rejet ou de toxicité de la part de l'organisme auquel il pourrait être injecté. Avantageusement, il s'agit, pour l'application en thérapeutique humaine, d'un polymère biodégradable, par exemple un polymère pouvant être dégradé par les cellules possédant des enzymes lysozomiaux, telles que les macrophages.

De tels matériaux biodégradables peuvent être des polymères d'acide lactique et glutamique ou des polymères utilisés pour des usages biomédicaux, et en particulier ceux utilisés dans les sutures.

Une telle microparticule peut porter à sa surface outre des protéines antigéniques, des molécules susceptibles d'activer le système immunitaire, telles que des interleukines, en particulier l'interféron-gamma ou l'interleukine 4.

Ces microparticules peuvent porter une ou plusieurs protéines qui peuvent elles-mêmes comprendre chacune un ou plusieurs épitopes. De tels protéines peuvent être des glycoprotéines, des peptides synthétiques contenant un épitope ou plusieurs épitopes, ou toute autre molécule non protéique ou contenant une partie protéique pouvant induire une réponse immunitaire.

L'invention a pour autre objet des médicaments ou vaccins comprenant les microparticules décrites ci-dessus, ainsi que des compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles les comprennent, en association avec des diluants ou des adjuvants pharmaceutiquement compatibles.

La présente invention est de manière générale relative à l'utilisation de microparticules en matériau synthétique polymère portant en surface une ou plusieurs protéines liées de manière covalente, la ou lesdites protéines portant chacune un ou plusieurs épitopes T ou B, pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin pour l'induction d'une réponse

immunitaire, selon laquelle les densités de la ou des protéines à la surface des microparticules sont ajustées afin d'orienter ladite réponse immunitaire vers une réponse majoritairement humorale ou majoritairement cellulaire.

5 Sous un autre aspect, l'invention a aussi pour objet un procédé pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin dont la réponse immunitaire est soit majoritairement humorale soit majoritairement cellulaire, de type Th1 ou Th2, ledit
10 procédé étant caractérisé en ce qu'on fixe de manière covalente sur des microparticules ou billes en matériau synthétique polymère au moins une protéine portant un ou plusieurs épitopes en faisant varier la densité de la protéine fixée à la surface selon le type de réponse désirée.

15 Afin d'induire une réponse cellulaire et humorale, on utilisera préférentiellement des microparticules présentant une densité pour chacune des protéines portant un épitope d'au minimum 10^5 et préférentiellement d'environ $5 \cdot 10^5$ molécules/ μm^2 . De telles densités correspondent environ pour
20 une bille d'un diamètre de $1\mu\text{m}$ à des quantités de protéines à la surface de la microparticule respectivement de 10^5 et $4 \cdot 10^5$ molécules .

25 En vue de l'induction d'une réponse majoritairement cellulaire, CD4^+ , classe II restreinte, on utilisera, préférentiellement, des microparticules présentant une densité pour chacune des protéines portant un épitope comprise entre environ 10^4 et $5 \cdot 10^4$ molécules de protéines/ μm^2 .

Les autres caractéristiques de ces microparticules sont celles mentionnées plus haut concernant les microparticules à haute densité.

30 Les protéines et antigènes liés de manière covalente aux microparticules dépendent de l'application prévue desdites microparticules.

Elles dépendent également du type de réponse immunitaire que l'on souhaite induire, mais aussi de la
35 maladie ou de l'affection que l'on souhaite traiter ou dont on

souhaite prémunir le sujet.

A titre d'exemple, on pourra utiliser les épitopes de la région Pre S2 de l'antigène HBS du virus de l'hépatite virale dont les séquences sont les suivantes:

- 5 - épitope T: Pre S:T (120-132)

MQWNSTTFHQTLQ

- 10 - épitope B: Pre S:B (132-145)

QDPRVRGLYFPAGG

15 On peut aussi citer à titre d'exemples les épitopes de la protéine VP1 du virus de la poliomyélite dont les séquences sont les suivantes:

- épitope T: C3:T (103-115)

20

KLFAVWKITYKDT

- épitope B: C3:B (93-193)

25

DNPASTTNKDK

Un autre exemple de séquence est l'épitope de la boucle V3 de la protéine GP120 du virus HIV1 dont la séquence est la suivante:

30

- épitope T + B: boucle V3

INCTRPNNNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKIGNMRQAHNCNI

35

On utilisera préférentiellement les épitopes B pour induire une réponse humorale à l'aide de microparticules à forte densité et les épitopes T pour induire une réponse majoritairement cellulaire à l'aide de microparticules à faible densité en protéines de surface.

40

De telles microparticules seront injectées aux patients que l'on veut traiter de manière thérapeutique ou prophylactique par les moyens connus de l'homme du métier, par exemple par injection sous-cutanée, intrapéritonéale,

intraveineuse, ou par tout autre moyen permettant d'induire une réponse immunitaire.

On se reportera à ce sujet à Current protocols in immunology ,(Edited by J.F. Coligen, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober Wiley- Intersciences Editors) dans lequel sont répertoriées les techniques d'immunisation.

Un des avantages particuliers de la présente invention réside dans le fait qu'elle permet d'induire des réponses immunitaires humorale ou cellulaire sans adjonction d'adjuvants aux billes ou microparticules. Néanmoins, l'adjonction d'adjuvants non toxiques et n'entraînant pas de réaction immunitaire parasite est aussi envisageable dans le cadre d'une utilisation selon la présente invention.

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples qui suivent dans lesquels:

Les diagrammes de la Figure 1 sont des résultats d'analyses par fluorométrie (FACS) de microparticules portant des antigènes LH ou TNP-LH. Les ordonnées indiquent l'anticorps utilisé (PBS-témoin, anti-LH, anti-TNP). Les abscisses indiquent les types de microparticules testées: B (LH), B (TNP-LH), B (OVA) et B (OVA-TNP) qui correspondent à des microparticules sur lesquelles sont liés respectivement le LH, le TNP-LH, l'ovalbumine et l'ovalbumine-TNP.

Les figures 2A à 2D représentent la capacité de cellules de rate, de macrophages et de cellules spécifiques B du TNP et activées par le LPS à présenter respectivement le LH, le TNP-LH, des microparticules portant du LH et des microparticules portant le TNP-LH.

La Figure 3 est une courbe indiquant les réponses prolifératives de cellules ganglionnaires de souris immunisées par le lysozyme soluble et stimulées in vitro par le lysozyme soluble (figure 3A) ou par des microparticules portant le lysozyme de diamètres 0,25, 0,75 et 1,5 μ m (figure 3B) . La prolifération cellulaire est mesurée par l'incorporation de

thymidine (CPM) en ordonnées, tandis que la dilution des microparticules est indiquée en abscisses.

La Figure 4 représente la production d'IL2/IL4 par un hybridome spécifique du lysozyme après stimulation par du lysozyme soluble (figure 4A) ou par des microparticules portant du lysozyme (figure 4B) . Les concentrations des microparticules sont indiquées en abscisses, tandis que la prolifération est indiquée en ordonnées.

Les Figures 5A et 5B représentent l'activation de l'hybridome T spécifique du lysozyme mesurée par la production d'IL2/IL4 après stimulation par le lysozyme soluble (figure 5A) ou couplé aux microparticules (figure 5B) en présence de splénocytes ou de cellules B(A20) comme cellules présentant l'antigène.

Les Figures 6A et 6B représentent la prolifération in vitro après stimulation par le lysozyme soluble de cellules de ganglions inguinaux de souris immunisées respectivement par du lysozyme soluble en adjuvant complet de Freund (Figure 6A) et par du lysozyme couplé à des microparticules (Figure 6B).

Les figures 7A et 7B représentent la prolifération in vitro après stimulation par le lysozyme de cellules de ganglions inguinaux de souris immunisées par diverses concentrations de lysozyme soluble (7A) ou couplé à des microparticules (7B).

La figure 8 représente la prolifération de cellules ganglionnaires de souris immunisées par le lysozyme en adjuvant complet de Freund ou en PBS en présence de microparticules couplées au LH .

Les Figures 9A et 9B représentent respectivement les taux d'anticorps anti-lysozyme (Figure 9A) et d'anticorps anti-LH (Figure 9B) de souris immunisées avec du lysozyme et de l'adjuvant alun , des microparticules portant du lysozyme ou des microparticules portant du LH.

La Figure 10 représente la prolifération de cellules de souris immunisées par injection de lysozyme en présence

d'adjuvant de Freund , après stimulation in vitro par des microparticules portant du lysozyme à différentes densités.

La Figure 10B représente la prolifération in vitro de cellules de souris immunisées in vivo par du lysozyme ou des billes portant du lysozyme après stimulation par différentes concentrations de lysozyme.

La Figure 11 est un diagramme illustrant la production d'anticorps anti-lysozyme de cellules de souris immunisés par injection de lysozyme et d'adjuvant de Freund ou de microparticules portant du lysozyme.

EXEMPLE 1:

Préparation de billes couplées à LH ou à l'ovalbumine.

1. Matériel et méthodes et présentation par des cellules B ou par des macrophages .

Les souris sont des femelles BALB/c et DBA/2 âgées de 6 à 8 semaines.

Les antigènes sont le LH et l'ovalbumine (OVA) commercialisés par Sigma Chemical (St-Louis, USA). L'hémocyanine trinitrophénylée (TNP4-LH) a été préparée telle que décrit précédemment (Shutze et al., J. Immunol. (1989) 142:2635).

1.1 Couplage covalent des antigènes ou microparticules de poly(acroléine).

Des microparticules de poly(acroléine) d'un diamètre compris entre 0,25 et 1,5 μ m, commercialisées par Polysciences Inc. (Washington PA), sont couplées à l'ovalbumine ou au LH comme décrit précédemment (Rembaum et al. Immunol. (1982) 52:341; Ziegler et al. Eur. J. Immunol. (1987) 17:1287).

1 ml de ces microparticules est lavé deux fois dans du PBS et resuspendu dans 1 ml de LH ou d'ovalbumine (5 mg/ml dans du PBS). Après trois heures d'incubation à température ambiante, les microparticules sont lavés deux fois dans du PBS et resuspendus dans 2 ml de PBS contenant 1% de sérum albumine bovine (BSA) et des antibiotiques. Les microparticules ainsi obtenues sont stockées à 4°C jusqu'à utilisation.

Les microparticules portant les antigènes TNP-OVA ou TNP-LH sont préparées par incubation de microparticules portant l'OVA ou le LH avec du TNBS (Trinitrobenzène sulfonate).

5 2 ml des microparticules qui ont été couplées au LH ou à l'ovalbumine sont lavés deux fois dans du PBS et resuspendus dans 2 ml de tampon cacodylate contenant 10 mg/ml de TNBS. Les microparticules sont incubées 30 minutes dans l'obscurité à la température ambiante et lavées trois fois dans du PBS. Elles
10 sont resuspendues dans 2 ml de PBS contenant 1% de BSA et des antibiotiques et stockées à 4°C.

1.2 Analyse par cytofluorométrie de flux.

50 µl de microparticules sont lavés deux fois dans du PBS contenant 1% de BSA et incubés durant 40 minutes à 4°C
15 avec du sérum de souris anti-LH ou anti-TNP. Après deux lavages, les microparticules sont incubées avec des anticorps de chèvre couplés au FITC (fluoroisothiocyanate) dirigés contre des immunoglobulines de souris (Biosys, Compiègne, France) durant 40 minutes à 4°C.

20 Après quatre lavages, les microparticules sont resuspendues dans 1 ml de PBS contenant 1% de BSA.

L'intensité de fluorescence est mesurée en utilisant le cytomètre de flux FACSCAN (Becton Dickinson, Mountain View.CA).

25 1.3 Milieu de culture.

Les lymphocytes sont cultivés dans du RPMI 1640 (Seromed, Munich, FRG) complétés avec de la L-glutamine 2mM, 10% de FCS (sérum de veau foetal) inactivé par la chaleur, du 2-ME 50µM et des antibiotiques.

30 1.4 Etablissement de la lignée cellulaire Th spécifique du LH.

Cette lignée cellulaire est établie et maintenue selon le protocole décrit par Taylor et al. (ed. IRL Press. New York) et Galelli et al. (J. Immunol. (1990) 145:2397).

35 Des cellules de ganglions inguinaux (4×10^6 /ml) de

souris DBA/2 ayant subi 8 jours avant le prélèvement des cellules, une injection de 100 µg de LH en émulsion dans de l'adjuvant complet de Freund à la base de la queue ont été cultivées durant 4 jours dans du milieu de culture en présence de LH (100 µg/ml).

Les cultures sont incubées dans une atmosphère humide à 7,5% de CO₂ à 37°C.

Une lignée cellulaire a été établie à partir de cette culture initiale par des passages en série de cellules T purifiées sur Ficoll ($2 \cdot 10^5$ /ml) en présence de cellules de rate de souris DBA/2 irradiées (3000 rad) durant 6 à 8 jours (période de repos) ou avec des cellules de rate irradiées plus du LH (100 µg/ml) durant 4 jours (période de stimulation).

Les cellules T utilisées dans les expériences sont récoltées 8 à 10 jours après leur dernière mise en présence du LH.

1.5 Estimation de la prolifération des cellules Th.

Des cultures en triplicats contenant $5 \cdot 10^4$ cellules Th purifiées sur Ficoll, et $5 \cdot 10^4$ cellules B mémoire spécifiques du TNP purifiées et irradiées (900 rad), ou $5 \cdot 10^5$ cellules de rate totales irradiées (3000 rad), ou 10^5 cellules de rate adhérentes irradiées (3000 rad), ou 10^5 cellules B de lymphome A20 positives pour le MHC de classe II irradiées (3300 rad) (Kim et al. J. Immunol. (1979) 122:549), ou 10^5 cellules B vierges spécifiques du TNP et activées par le LPS comme source de cellules présentant les antigènes, et différentes concentrations d'antigène ont été incubées dans des plaques de microculture à fond plat (Corning, Cambridge, MA) sous un volume total de 0,2 ml/puits de milieu complet. La prolifération cellulaire T a été estimée par incorporation de la thymidine tritiée durant les huit dernières heures d'une culture de 3 jours.

Les résultats sont exprimés comme la moyenne géométrique de trois cultures, une fois éliminé le bruit de fond. L'écart type est inférieur à 15 % de la moyenne.

1.6 Cellules B spécifiques du TNP.

Les cellules B spécifiques du TNP de souris normales sont purifiées par liaison et élution sur une gélatine-TNP8 et selon la technique décrite par Haas et Layton J.E., J. Exp. Med. (1975) 141:1004.

5 Ce protocole a été modifié afin d'obtenir des populations enrichies en cellules B mémoires spécifiques du TNP à partir de la rate de souris précocement immunisées, comme précédemment décrit (Galelli et al. J. Immunol. (1990) 145:2397). Les cellules B mémoire spécifiques du TNP ont été
10 sélectionnées sur de la gélatine portant un haptène (gélatine-TNP2), en testant l'affinité des récepteurs pour le TNP par comparaison aux cellules B vierges, et la capacité à sécréter de larges quantités d'immunoglobulines G anti-TNP en présence
15 de faibles concentrations d'antigènes.

10^8 cellules de rate ne contenant ni érythrocytes ni cellules mortes ont été suspendues dans 3 ml de HEPES (50 mM) tamponnées par du DMEM (Seromed, Munich, Allemagne) et incubées dans des boîtes de Pétri en plastique recouvertes de
20 gélatine-TNP2. Les boîtes sont agitées de manière douce durant 15 minutes à 4°C, puis lavées 10 fois par du DMEM à la température de la glace. Les cellules adhérentes sont éluées en ajoutant 5 ml de DMEM réchauffé à 37°C et la gélatine-TNP liée est éliminée par digestion par la collagénase
25 (Collagenase CLSIII de Worthington Biochemicals Freehold, New Jersey, 100 U/ml) durant 15 minutes à 37°C.

Ce protocole conduit à l'obtention finale, exprimée comme un pourcentage par rapport au nombre de cellules de rate d'origine, de 0,3 à 0,6 % de cellules liant le TNP à partir de
30 rate de souris immunisées. Les cellules sont cultivées toute la nuit avant l'addition d'autres cellules et réactifs afin de permettre la réexpression d'immunoglobulines de surface modifiées par le traitement par la collagénase. La présence de récepteurs libres du TNP sur ces cellules est évaluée par leur
35 capacité à lier des érythrocytes portant à leur surface du

TNP.

55 à 76 % des cellules obtenues à partir de souris immunisées forment des rosettes avec des SRBC modifiées par le TNP. Ces cellules ne prolifèrent pas en réponse à la concanavaline A mais sont enrichies 20 fois, pour les cellules qui secrètent les immunoglobulines G anti-TNP après stimulation par TNP-LH, par comparaison aux cellules de rate non fractionnées.

10 1.7 Cellules B vierges spécifiques du TNP et activées par le LPS

Des cellules B vierges spécifiques du TNP de souris et non immunisées ont été purifiées par liaison puis élution sur de la gélatine-TNP8 comme décrit précédemment. Ces cellules ont été cultivées à une densité de $2 \cdot 10^6$ par ml dans un milieu contenant 50 $\mu\text{g/ml}$ de LPS (Salmonella enteritidis, Difco Laboratories, Détroit, MI) durant 3 jours. Les lymphoblastes non adhérents ont été purifiés en utilisant du Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Piscataway, NJ), puis lavés et utilisés comme cellules accessoires.

20 1.8 Macrophages.

Les macrophages ont été obtenus à partir de cellules de rate non immunisées par adhésion durant 4 heures à 37°C suivie d'un lavage des cellules afin d'éliminer les cellules non adhérentes tel que décrit précédemment (Kakiochi et al. J. Immunol. (1983) 131:109).

25 2. Résultats.

2.1 Vérification du couplage de l'antigène aux microparticules.

30 Le LH a été couplé de manière covalente à des microparticules de polyacroléine d'un diamètre de 0,25 à 1,5 μm . Le couplage du LH aux microparticules a été contrôlé par analyse en cytofluorométrie de flux en utilisant un sérum de souris anti-LH.

35 Les résultats obtenus avec des microparticules de 1,5 μm sont indiqués sur la Figure 1.

Les microparticules de 1,5 μm ont été couplées à l'ovalbumine (B OVA) ou à la LH (B LH). Les microparticules TNP-OVA ou TNP-LH (respectivement désignées B(TNP-OVA), B (TNP-LH) ont été préparées par incubation de microparticules portant l'OVA ou le LH avec du TNBS. L'analyse par cytofluorométrie a été effectuée sur des microparticules incubées en présence de PBS ou en présence de sérum de souris anti-LH ou anti-TNP. Après lavage, les microparticules ont été incubées avec des anticorps de chèvre liés au FITC dirigés à l'encontre des immunoglobulines de souris et ont été analysées par cytométrie de flux.

Des résultats similaires ont été obtenus avec des microparticules de 0,25 et 0,75 μm .

Les microparticules témoins couplées avec de l'ovalbumine n'ont pas été reconnues par le sérum anti-LH.

2.2. Comparaison de la capacité de diverses populations de splénocytes à présenter des antigènes solubles ou particulaires.

La capacité de splénocytes non fractionnés, de macrophages et de cellules B vierges spécifiques pour le TNP a été comparée quant à leur présentation de LH et de TNP-LH soluble ou particulaire à des cellules T spécifiques du LH.

Dans ces expériences, des populations de splénocytes ont été préparées à partir de souris non immunisées. Après purification, les cellules B spécifiques du TNP ont été activées durant trois jours par du LPS; on sait en effet que les lymphoblastes induits par le LPS sont des cellules très efficaces quant à la présentation d'un antigène (Kakiochi et al. J. immunol. (1983) 131:109).

Les résultats sont illustrés sur la Figure 2 pour laquelle $5 \cdot 10^5$ splénocytes irradiés, 10^5 cellules adhérentes ou 10^5 cellules B vierges spécifiques du TNP activées par le LPS ont été cultivées avec $5 \cdot 10^4$ cellules Th spécifiques du LH en présence de quantités variées de LH soluble (A), de TNP-LH soluble (B) ou fixés sur des microparticules (B (LH) (C) ou de

B (TNP-LH) (D)). La prolifération cellulaire Th a été estimée au jour 3.

Comme le montre la Figure 2 (2A et 2B), les macrophages et les cellules B activées par le LPS stimulent de manière efficace les cellules T quand ils sont incubées avec du LH ou du TNP-LH solubles.

Contrairement à ces résultats, seuls les macrophages, et non les cellules B spécifiques du TNP et activées par le LPS sont capables de stimuler les cellules T spécifiques du LH (Figures 2 C et D) quand des microparticules portant du LH ou du TNP-LH sont utilisées.

Ces résultats montrent que les macrophages sont responsables de l'activité de présentation de l'antigène des cellules spléniques quand des antigènes particuliers sont utilisés.

Ainsi l'incapacité de cellules B spécifiques du TNP à présenter l'antigène particulaire a été illustrée.

EXEMPLE 2.

Induction d'une réponse proliférative T, CD4⁺ spécifiques du lysozyme in vivo et in vitro par des microparticules couplées au lysozyme .

1. MATERIELS ET METHODES.

1.1 Antigènes

Le lysozyme (LYSO) et l'hémocyanine de Limulus (LH) proviennent des Laboratoires Sigma.

1.2 Couplage de l'antigène aux microparticules

L'antigène soluble est rendu particulaire par couplage à des microparticules (Polysciences) de 0.2 à 1µm de diamètre. Deux méthodes de couplage sont utilisées:

1.2 a) Couplage covalent directement sans agent activant.

Les billes ou microparticules de polyacroléine portent des groupements aldéhyde capables de réagir spontanément avec les fonctions amines des protéines.

1 ml de billes est lavé 4 fois dans du PBS, et repris dans 1 ml d'antigène à 5 mg/ml. Après 3 heures d'incubation à

température ambiante, les billes sont lavées 3 fois dans du PBS et incubées 30 minutes dans 1 ml de PBS-Albumine humaine 1% afin de saturer les groupements réactifs libres des billes. Puis après lavage, les particules sont reprises dans 2 ml de PBS-albumine humaine 1%-antibiotique 1% puis conservées à +4°C.

b) Couplage covalent par le glutaraldéhyde.

L'antigène est couplé aux billes de polystyrène par le glutaraldéhyde, capable de former une base de Schiff avec les groupements amines des protéines.

0,5 ml de billes est lavé 3 fois dans du PBS et repris dans 0,5 ml de glutaraldéhyde 8%. Après 6 heures d'incubation à température ambiante, les billes sont lavées 2 fois et reprises dans 1 ml d'antigène à 400µg/ml. Après incubation pendant la nuit à température ambiante, les billes sont lavées et incubées avec 1 ml d'éthanolamine 0,2 M pendant 30 minutes afin de bloquer les fonctions aldéhyde libres du glutaraldéhyde.

Après un dernier lavage, les particules sont reprises dans 1 ml de PBS- albumine humaine 1%-antibiotique 1% puis conservées à +4°C.

Cette méthode de couplage permet de déterminer la quantité de protéines couplées sur les microparticules par spectrophotométrie. Les absorbances de la solution de protéine à 400 µg/ml et du surnageant obtenu après l'incubation des billes avec cette solution de protéine sont mesurées à 280 nm. Connaissant le nombre de billes utilisées pour le couplage, on considère que la différence entre la quantité de protéine avant couplage et la quantité résiduelle après couplage, permet d'estimer la quantité de lysozyme couplée par particule.

1.3 Protocole d'immunisation.

On a utilisé des femelles BALB/c, d'haplotype H-2^d, âgées de 6 à 8 semaines (élevage de l'Institut Pasteur).

- immunisation par voie intra-péritonéale: on injecte

100 µg de lysozyme avec 1 mg d'alum, ou, différentes quantités d'antigène couplé aux billes sans adjuvant,

5 - immunisation par voie sous-cutanée: à la base de la queue, on injecte 100 µg de lysozyme en émulsion dans l'adjuvant complet de Freund, ou, différentes quantités d'antigène couplé aux billes.

Le sérum de chaque souris est prélevé 7 ou 14 jours après chaque injection. La teneur en anticorps des sérums est mesurée par test ELISA.

10 La réponse proliférative cellulaire est mesurée sur les ganglions inguinaux et/ou sur la rate, prélevés 7 et/ou 14 jours après chaque injection.

1.4 Détection des anticorps par ELISA.

15 L'antigène (lysozyme) est incubé à la concentration de 5µg/ml en tampon carbonate 50 mM-pH=9.6, dans des microplaques (Nunc) pendant une nuit à 4°C. Après lavage avec un tampon PBS-Tween 20 à 0,01%, les différentes dilutions des sérums à tester, réalisées en tampon BSA 1%, sont incubées pendant 1 heure à 37°C. Après lavage, on dépose 100 µl par puits d'un

20 conjugué anti-Ig de souris (anti-Ig totales fournis par Diagnostics Pasteur et anti-Ig spécifiques par Sigma), marqué à la peroxydase, préparé chez la chèvre; qui est incubé pendant 1 heure à 37°C. Après lavage, on ajoute la solution de substrat préparée extemporanément: Orthophénylènediamine à 0,5

25 mg/ml (Sigma) en tampon acide citrique 0.1 M-phosphate disodique 0.2M-pH=5 auquel on ajoute H₂O₂ au 1/2500.

Une coloration jaune révèle la présence d'anticorps spécifiques; la réaction enzymatique est arrêtée 8 minutes plus tard, par 50 µl de H₂SO₄ (11,5%).

30 L'absorbance de chaque puits est mesurée à 492 nm, par un lecteur de densité optique (Dynatech). Le contrôle négatif est réalisé avec du sérum au 1:100 de souris BALB/c non immunisées. Les résultats sont exprimés: soit en DOx1000 à partir de l'absorbance mesurée, corrigée de l'absorbance en

35 absence de sérum; soit par le titre en anticorps calculé à

partir de régression linéaire basée sur l'absorbance obtenue avec le sérum de souris BALB/c non immunisées.

5 Lorsque l'antigène est sous forme particulaire, le test ELISA est réalisé en tubes. Les dilutions des sérums à tester sont incubées directement avec l'antigène couplé aux billes (8.10^8 particules/ml). Les lavages se font par centrifugation dans le tampon PBS-Tween 20 (0.01%). Lorsque la réaction enzymatique est terminée, 200 μ l de chaque tube sont transférés en microplaque puis l'absorbance est mesurée.

10 1.5 Inhibition de la fixation des anticorps anti-lysozyme par test ELISA.

15 Le test ELISA mesure la fixation des anticorps spécifiques présents dans le sérum de souris BALB/c immunisées par le lysozyme. Cette fixation est diminuée si le sérum est préincubé (avant le test ELISA) avec l'antigène: lysozyme soluble ou couplé aux billes, qui se comporte alors, comme un inhibiteur.

20 Le sérum anti-lysozyme est préincubé avec le lysozyme soluble ou couplé aux billes, pendant 1 heure à 37°C puis la nuit à 4°C; la réaction se faisant en tubes. La fixation des anticorps non-liés à l'inhibiteur est évaluée par test ELISA (triplicats) en microplaques, dont les puits ont été recouverts par du lysozyme à 5 μ g/ml. L'absorbance de chaque puits est mesurée à 492 nm, et corrigée de l'absorbance en absence de sérum. Le contrôle négatif est réalisé avec du sérum au 1:100 de souris BALB/c non immunisées. L'absorbance sans inhibiteur lors de la préincubation de sérum, correspond à la fixation maximale d'anticorps anti-lysozyme.

25 Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de fixation des anticorps et calculé selon le rapport

30 DO sans inhibiteur-DO avec inhibiteur

DO sans inhibiteur

35 La détermination graphique de la concentration de lysozyme soluble ainsi que du nombre de billes couplées au

lysozyme, nécessaire pour 50% d'inhibition, permet d'estimer la quantité de lysozyme fixée par particule.

1.6 Stimulation d'un hybridome T spécifique du lysozyme

5 Un hybridome T a été produit par immunisation de souris BALB/c avec du lysozyme. Il reconnaît spécifiquement le peptide 108-116 du lysozyme, en association avec les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II I-E^d.

10 10^5 cellules d'hybridome T sont stimulées par des concentrations croissantes d'antigène: lysozyme ou billes couplées, en présence de différentes cellules présentatrices de l'antigène: $5 \cdot 10^5$ splénocytes irradiés (3000 rad) de souris BALB/c ou 10^5 cellules de lymphome B A20, restreintes par les molécules de CMH de classe II. Les cellules sont mises en
15 culture (triplicats) dans un milieu complet RPMI 1640 (SEROMED) additionné de 10% de sérum de veau foetal décomplémenté, 50 μ M de β -mercaptoéthanol, 2mM de glutamine, 100 UI/ml de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine, en microplaque à fond plat (Corning 25860). Le témoin positif est
20 réalisé par stimulation de l'hybridome par le mitogène de lymphocytes T: concanavaline A à 5 μ g/ml.

Le surnageant est prélevé après 24h de culture à 37°C (7.5%CO₂), puis congelé à - 20°C pendant 16h minimum. La stimulation de l'hybridome est mesurée par la teneur en IL2 du
25 surnageant dans un test de prolifération de cellules CTL-L. Les écarts types ne sont pas mentionnés, car l'erreur est inférieure à 10% de la moyenne des triplicats.

1.7 Dosage de l'IL2 et de l'IL4

30 La lignée CTL-L est dépendante de l'Interleukine 2 et de l'Interleukine 4; elle est maintenue en culture en milieu complet enrichi de 20% de surnageant de splénocytes de rat, incubés 36h avec 2,5 μ g/ml de concanavaline A.

Après décongélation, les surnageants de cultures (testés au 1/2) sont incubés en présence de $2,25 \cdot 10^4$ cellules
35 CTL-L, préalablement lavées trois fois dans le milieu

RPMI1640, pendant 3 jours à 37°C (7,5% CO₂).

La prolifération cellulaire est mesurée par addition de thymidine tritiée d'activité spécifique 1 Ci/mme, à raison de 2 µCi/ml de culture, pendant les 16 dernières heures de culture.

L'ADN des cellules est récupéré après lyse des cellules et filtration à l'aide d'un "Skatron". L'incorporation de radioactivité est comptée par scintillation à l'aide d'un compteur-bêta.

Les résultats sont exprimés en cpm à partir de la moyenne des triplicats, corrigée de la radioactivité incorporée en l'absence d'antigène.

1.8 Test de prolifération

La rate et/ou les ganglions inguinaux sont prélevés stérilement 7 ou 14 jours après l'immunisation des souris (voir protocole d'immunisation). 8.10⁵ cellules sont incubées en présence de différentes concentrations d'antigène, soluble ou couplé aux billes. Les cellules sont mises en culture (triplicats) dans du milieu RPMI 1640 (SEROMED) additionné de 1.5% de sérum de veau foetal décomplémenté, 0,5% de sérum normal de souris, 50 µM de β2-mercaptoéthanol, 2mM de glutamine, 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine; en microplaques (Corning 25860) pendant 4 jours à 37°C (7,5% CO₂).

La prolifération des cellules est mesurée par incorporation de thymidine tritiée, d'activité spécifique 25 Ci/mme, à raison de 2 µCi/ml de culture, pendant les 16 dernières heures. L'ADN des cellules est récupéré après lyse des cellules et filtration à l'aide d'un Skatron, l'incorporation de radioactivité est comptée par scintillation à l'aide d'un compteur-bêta.

Les résultats sont exprimés en cpm à partir de la moyenne des triplicats, corrigée de l'incorporation en absence d'antigène.

2 - RESULTATS.

2.1. Stimulation par le lysozyme couplé aux microparticules de cellules ganglionnaires de souris immunisées par le lysozyme.

5 Dans les essais illustrés aux Figures 3A et 3B, des souris BALB/c ont été immunisées par injection sous-cutanée à la base de la queue avec du lysozyme soluble complémenté avec de l'adjuvant de Freund (CFA) .

10 Après 14 jours, les ganglions inguinaux ont été prélevés, et la réponse proliférative de ces cellules a été testée in vitro contre différentes concentrations de lysozyme ou contre différentes concentrations de microparticules couplées au lysozyme . Les résultats sont exprimés en cpm corrigés de la valeur obtenue sans antigène.

15 Le lysozyme soluble induit une prolifération importante des cellules de souris immunisées par cet antigène en adjuvant de Freund (3A). La stimulation in vitro de ces mêmes cellules par les microparticules-lysozyme révèle que celles-ci sont capables d'induire une très forte prolifération cellulaire (figure 3B). Les microparticules de plus grand diamètre , 0,81 et 0,96 μm (couplage spontané) , sont très efficaces.

20 2.2. Stimulation par le lysosyme couplé aux billes de l'hybridome T .

25 Les figures 4A et 4B correspondent aux résultats de stimulation de l'hybridome T, spécifique du lysozyme par le lysozyme soluble (4A) ou couplé aux microparticules (4B). Le degré de stimulation de l'hybridome a été mesuré par le taux d'IL-2/IL-4 produites .

30 En présence de splénocytes irradiés, l'hybridome T est stimulé fortement par le lysozyme soluble (figure 4A). En présence de ces cellules , les microparticules-lysozyme de grande taille (0,81 et 0,96 μm) entraînent également une production d'IL-2/IL-4 importante (figure 4B), contrairement aux microparticules de 0,5 et 0,25 μm qui ne sont pas capables de stimuler l'hybridome T spécifique.

2.3. Incapacité des cellules A20 de lymphome B à présenter le lysozyme couplé aux billes à l'hybridome T, spécifique du lysozyme.

On sait que des tumeurs cellulaires B portant des récepteurs Ia peuvent être utilisés comme cellules présentant des antigènes pour des antigènes qui n'ont pas de réactivité avec le récepteur Ig mais qui sont fixés par les tumeurs de cellules B par des mécanismes non spécifiques (Walker et al. J. Immunol. (1982) 128:2164; Glimcher et al. J. Exp. Med. (1982) 155:445; Mac Kean et al. J. Exp. Med. (1981) 154:1419; Mac Kean et al. J. Exp. Med. (1981) 154:1419).

On a donc testé la capacité d'une de ces tumeurs cellulaires B, la lignée A20, à présenter le lysozyme sous forme soluble ou particulaire .

La présentation du lysozyme soluble ou particulaire a été comparée en utilisant deux sources de CPA : soit une source hétérogène, les splénocytes totaux irradiés, soit des cellules B provenant du lymphome A20. Lorsque l'antigène est sous forme soluble (figure 5A), il peut stimuler l'hybridome T aussi bien en présence de splénocytes que des cellules B A20. Au contraire, le lysozyme particulaire est présenté uniquement par les splénocytes et non par les cellules B A20 (figure 5 B).

Ces résultats confirment que les splénocytes peuvent présenter aux cellules T un antigène , qu'il soit soluble ou sous forme particulaire . Par contre, les lymphocytes B sont incapables de présenter un antigène rendu particulaire par couplage à des billes d'une taille de l'ordre du micron.

2.4 Induction de réponses T prolifératives par injection à des souris de lysozyme couplé aux microparticules.

L'immunogénicité in vivo de l'antigène couplé aux microparticules a été analysée en immunisant des souris BALB/c avec du lysozyme en adjuvant complet de Freund ou avec cet antigène couplé à des billes de polyacroléine . Après 14 jours, les cellules des ganglions drainants de ces animaux ont

été stimulées in vitro par différentes concentrations de lysozyme soluble.

En présence de lysozyme soluble, les cellules ganglionnaires prolifèrent fortement, qu'elles proviennent de
5 souris immunisées avec le lysozyme soluble ou avec des microparticules-lysozyme (figure 6A) . Ceci démontre que dans les deux cas, des cellules T spécifiques du lysozyme ont été sensibilisées in vivo . Après injection à des souris de microparticules-LH représentant le contrôle de spécificité,
10 les cellules ganglionnaires de ces animaux sont incapables de proliférer en réponse à une stimulation par le lysozyme soluble in vitro (figure 6B). La réponse cellulaire in vitro est donc spécifique de l'antigène protéique couplé aux microparticules, utilisé lors de l'immunisation des souris.

15 La réponse proliférative des cellules sensibilisées par 109 microparticules-lysozyme (correspondant à 1 μ g de lysozyme) en absence d'adjuvant , est aussi élevée que celle des cellules d'animaux immunisés par 100 μ g de lysozyme soluble en adjuvant de Freund (CFA) (figure 6A). Pour
20 vérifier et préciser ce résultat, les réponses prolifératives des cellules ganglionnaires d'animaux ayant reçu différentes doses de lysozyme en CFA ou différentes concentrations de microparticules couplées ont été comparées, après stimulation in vitro par le lysozyme soluble .

25 Dans le cas des Figures 7A et 7B, des souris ont été immunisées par injection sous-cutanée à la base de la queue avec du lysozyme soluble et de l'adjuvant complet de Freund (CFA) (Figure 7A) ou des billes couplées à l'antigène sans aucun adjuvant (Figure 7B).

30 Après 14 jours, les ganglions inguinaux ont été prélevés, et la réponse proliférative de ces cellules a été testées in vitro contre différentes concentrations de lysozyme. Les résultats sont exprimés en cpm corrigés de la valeur obtenue sans antigène.

35 Sur la Figure 7B, il est à noter que les dénominations

10^9 , 10^8 , 10^7 et 10^6 B-LYSO correspondant respectivement à des poids de 1; 0,1; 0,01 et 0,001 μg en lysozyme.

Ces résultats démontrent que les cellules ganglionnaires des animaux immunisés avec des microparticules portant du lysozyme prolifèrent in vitro après mise en contact avec le lysozyme, indiquant ainsi une sensibilisation des cellules T spécifiques de cet antigène.

La comparaison des effets doses (Figure 7) indique que 1 μg de lysozyme couplé aux billes donne une réponse quasi-équivalente à celle de 1 μg d'antigène injecté en CFA.

La figure 8 représente la réponse proliférative des cellules de souris immunisées par le lysozyme en adjuvant complet de Freund (CFA) ou en PBS avec des microparticules couplées au LH. L'addition de billes LH au lysozyme ne permet pas d'induire des réponses prolifératives élevées ce qui indique que le lysozyme doit être couplé de façon covalente aux microparticules pour induire des réponses T prolifératives.

EXEMPLE 3.

Induction de réponse anticorps par des microparticules portant un antigène.

Les matériels et méthodes sont similaires à ceux de l'Exemple 2.

Pour les Figures 9A et 9B, des souris BALB/c ont été immunisées par injection intra-péritonéale avec 100 μg de lysozyme soluble en adjuvant (alum) ou avec les billes couplées à l'antigène: lysozyme ou Hémocyanine de Lumulus (LH), sans aucun adjuvant.

Les injections ont été faites à J0, J21, J42, les sérums ont été prélevés à J20, J31 (1er rappel + 10) J40 et J52 (2ème rappel); et testés en ELISA pour leur teneur en anticorps. Les résultats sont exprimés en \log_{10} du titre en anticorps anti-lysozyme (Figure 9A) et anti-LH (Figure 9B).

Trois injections d'antigène ont été faites i.p. aux jours 0, 21 et 42. Les microparticules-lysozyme donnent de

très bonnes réponses anticorps alors qu'aucune réponse anticorps n'est induite par les microparticules LH. Ces microparticules, par ailleurs, stimulent de façon très efficace les réponses T.

5 Une des différences entre le LH et le lysozyme réside dans leurs poids moléculaire (14500 pour lysozyme et 71000 pour LH).

10 A concentrations d'antigène couplé égales, la densité des molécules de LH sur les billes est donc environ 5 fois plus faible. Ceci pourrait expliquer l'absence de stimulation des réponses anticorps si celles-ci sont dues à la stimulation directe T-indépendante par l'antigène présent à forte densité sur les microparticules.

EXEMPLE 4

15 Effet de la densité en lysozyme à la surface de microparticules sur leur immunogénéicité

Les matériels et méthodes utilisés sont similaires à ceux de l'Exemple 2.

20 L'immunogénéicité des billes couplées avec du lysozyme et présentant un nombre de molécules variables à leur surface a été testée dans les expériences présentées Figures 10 et 11.

25 Pour la Figure 10A, des souris BALB/c ont été immunisées par injection sous-cutanée avec 100 µg de lysozyme en CFA. Après 14 jours les ganglions inguinaux ont été prélevés et les cellules testées in vitro contre les billes portant différentes densités de lysozyme (de 1100 à 950.000 molécules de lysozyme ramenées à des billes de 1 µm de diamètre). Les résultats sont exprimés en cpm corrigés de la valeur obtenue sans antigène.

30 Pour la Figure 10B, des souris BALB/c ont été immunisées par injection sous-cutanée à la base de la queue avec du lysozyme soluble avec adjuvant (CFA) ou 10^9 billes portant différentes densités de lysozyme sans aucun adjuvant.

35 Après 14 jours, les ganglions inguinaux ont été prélevés, et la réponse proliférative de ces cellules a été

testée in vitro contre différentes concentrations de lysozyme ou billes. Les résultats sont exprimés en cpm corrigés de la valeur obtenue sans antigène.

La prolifération des cellules ganglionnaires provenant d'animaux immunisés par le lysozyme soluble en CFA a été testée après stimulation in vitro par les différentes microparticules-lysozyme. La réponse proliférative de ces cellules étant d'autant plus forte que la densité du lysozyme en surface des microparticules est élevée. Aucune prolifération des cellules ganglionnaires n'est obtenue après stimulation par les microparticules présentant une densité de 1.100 molécules de lysozyme par microparticule (figure 10A).

Dans l'expérience de la figure 10B, l'immunogénicité de ces microparticules a été testée in vivo. Des souris BALB/c ont été immunisées par les différentes microparticules, sans adjuvant, et les cellules ganglionnaires de ces animaux ont été stimulées in vitro par différentes concentrations de lysozyme soluble.

La prolifération des cellules ganglionnaires provenant d'animaux immunisés par les microparticules couplées au lysozyme à forte densité (950.000 et 210.000) est élevée, et comparable à la réponse des cellules sensibilisées par 100 µg de lysozyme en CFA. Après immunisation par les microparticules portant une densité moyenne de lysozyme (45.000), les cellules prolifèrent en réponse au lysozyme in vitro à partir de 10^{-1} µg/ml. Les microparticules de plus faible densité n'ont pas sensibilisé les cellules T in vivo, car aucune prolifération n'a été observée en présence de lysozyme même à concentration élevée (figure 10B).

Il est à noter que 10^9 microparticules couplées avec le lysozyme à haute densité correspondent à 23µg (1-950.000-G) et 5 µg (1-210.000-G) de lysozyme couplé, cependant la prolifération des cellules est aussi élevée qu'après injection de 100 µg de lysozyme en CFA.

Pour la Figure 11, des souris BALB/c ont été

immunisées par injection sous-cutanée de lysozyme avec adjuvant (CFA) ou avec 10^9 microparticules portant différentes densités de lysozyme (950.000; 210.000, 45.000 et 1100 molécules respectivement, ramenées à une microparticule de 1
5 μm de diamètre).

Après 14 jours, les sérums ont été prélevés et testés en ELISA pour leur teneur en anticorps anti-lysozyme. Les résultats sont exprimés en \log_{10} du titre en anticorps.

La réponse humorale des souris immunisées par ces
10 microparticules présentant différentes densités de lysozyme a été étudiée. L'injection de 100 μg de lysozyme en CFA induit un taux élevé d'anticorps anti-lysozyme (figure 11) . Quatorze jours après l'immunisation, les billes couplées à la plus forte densité de lysozyme (950.000) ont induit une
15 production d'anticorps significative , alors que les billes de densité inférieure n'ont pas stimulé l'induction de réponse anticorps anti-lysozyme significative . Il faut noter , en particulier , que les billes de densité 210.000 qui ont induit une excellente prolifération spécifique du lysozyme n'ont pas
20 stimulé la production d'anticorps .

Ces résultats révèlent que la prolifération de cellules T est induite avec des densités de lysozyme allant de 45.000 à 950.000 molécules de lysozyme par microparticule , alors que la production d'anticorps nécessite une densité importante de
25 protéine couplée aux microparticules.

Au sens de la présente description, l'expression "microparticules " désigne des particules pouvant avoir diverses configurations géométriques et spatiales . Dans la pratique , il s'agit préférentiellement de microsphères ou
30 billes, telles qu'elles sont obtenues par les techniques usuelles de fabrication des polymères.

REVENDICATIONS

1. Utilisation de microparticules en matériau synthétique polymère, portant en surface une ou plusieurs protéines liées de manière covalente, la ou lesdites protéines portant chacune un ou plusieurs épitopes, pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin pour l'induction d'une réponse immunitaire, les densités de la ou des protéines à la surface des microparticules étant ajustées afin d'orienter ladite réponse immunitaire, vers l'induction d'une réponse humorale et cellulaire ou vers l'induction d'une réponse majoritairement cellulaire.

2. Utilisation selon la revendication 1, pour l'induction de réponses cellulaire et/ou humorale, caractérisée en ce que les microparticules présentent une densité pour chacune des protéines portant un épitope d'au minimum 10^5 molécules/ μm^2 et préférentiellement $5 \cdot 10^5$ protéines/ μm^2 .

3. Utilisation selon la revendication 1, pour l'induction d'une réponse majoritairement cellulaire, caractérisée en ce que les microparticules présentent une densité pour chacune des protéines portant un épitope, comprise environ entre 10^4 et $5 \cdot 10^4$ molécules/ μm^2 .

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les microparticules ont un diamètre moyen compris entre environ 0,75 et environ 1,5 μm , et préférentiellement de 1 μm .

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la liaison est effectuée par réaction des fonctions NH_2 et/ou CO des protéines et du matériau constituant la microparticule.

6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la liaison des protéines et du matériau constituant la microparticule est covalente et est effectuée par l'intermédiaire d'un agent pontant.

7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée

en ce que l'agent pontant est le glutaraldéhyde ou le carbodiimide.

5 8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ledit matériau est un polymère biocompatible.

9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisé en ce que ledit polymère est le polyacroléine ou le polystyrène ou des polymères d'acide lactique ou des copolymères d'acides lactique et glycolique .

10 10. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 9, pour la fabrication d'un médicament pour la thérapeutique humaine, caractérisée en ce que ledit polymère est biodégradable.

15 11. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que les microparticules portent en surface des molécules susceptibles d'activer le système immunitaire.

20 12. Procédé pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin dont la réponse immunitaire est soit majoritairement humorale soit majoritairement cellulaire, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'on fixe de manière covalente sur des microparticules en matériau synthétique polymère au moins une protéine portant un ou plusieurs épitopes ou des peptides contenant uniquement des épitopes T ou B ou une composition des deux en faisant varier la densité de la protéine fixée à la surface selon le type de réponse désirée.

25 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'on utilise des microparticules comme indiqué à l'une quelconque des revendications 1 à 11.

30 14. Microparticule en un matériau synthétique polymère portant en surface une ou plusieurs protéines liées de manière covalente au matériau constituant la microparticule, la ou lesdites protéines portant chacune un ou plusieurs épitopes, et étant présentes à des densités comprises entre 10^4 et 5.10^5 protéines/ μm^2 pour chacune des protéines.

35 15. Microparticule selon la revendication 14,

caractérisée en ce qu'elle a un diamètre moyen compris entre environ 0,25 μm et 1,5 μm , et préférentiellement de 1 μm .

5 16. Microparticule selon l'une des revendications 14 et 15, caractérisée en ce que la liaison est effectuée par réaction des fonctions NH_2 et/ou CO des protéines et du matériau constituant la microparticule.

10 17. Microparticule selon l'une des revendications 14 et 15, caractérisée en ce que la liaison des protéines et du matériau constituant la microparticule est effectuée par l'intermédiaire d'un agent pontant.

18. Microparticule selon la revendication 17, caractérisée en ce que l'agent pontant est le glutaraldéhyde, ou le carbodiimide.

15 19. Microparticule selon l'une des revendications 14 à 18, caractérisée en ce qu'elle est composée d'un polymère biocompatible.

20 20. Microparticule selon la revendication 19, caractérisée en ce que ledit polymère est la poly(acroléine) ou le polystyrène, un polymère d'acide lactique ou un copolymère d'acide lactique et glycolique.

21. Microparticule selon la revendication 19, pour l'application en thérapeutique humaine, caractérisée en ce que ledit polymère est biodégradable.

25 22. Microparticule selon l'une des revendications 14 à 21, caractérisée en ce qu'elle porte en surface des molécules susceptibles d'activer le système immunitaire.

30 23. Microparticule selon l'une des revendications 14 à 22, caractérisée en ce que ladite protéine comprend l'épitope B de la région pré-s₂ de l'antigène HBs du virus de l'hépatite virale.

24. Microparticule selon l'une des revendications 14 à 22, caractérisée en ce que ladite protéine comprend l'épitope B de la protéine VP1 du virus de la poliomyélite.

35 25. Microparticule selon l'une des revendications 14 à 22, caractérisée en ce que ladite protéine comprend l'épitope

B de la protéine gp 120 du virus HIV-1.

26. Médicament ou vaccin, caractérisé en ce qu'il comprend des microparticules selon l'une des revendications 14 à 25.

- 5 27. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend des microparticules selon l'une des revendications 14 à 25 en association avec des diluants et adjuvants pharmaceutiquement compatibles.

1/10

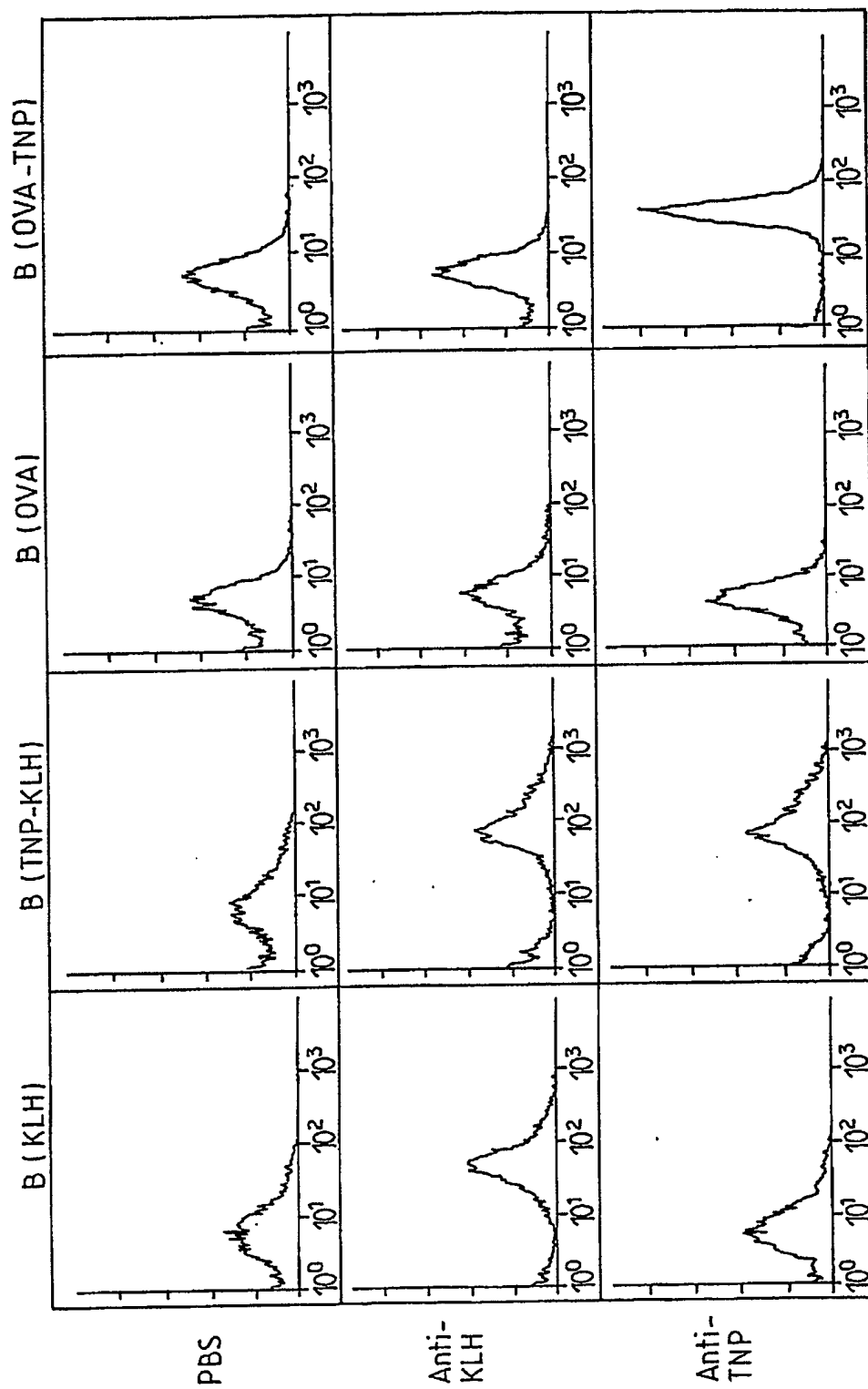
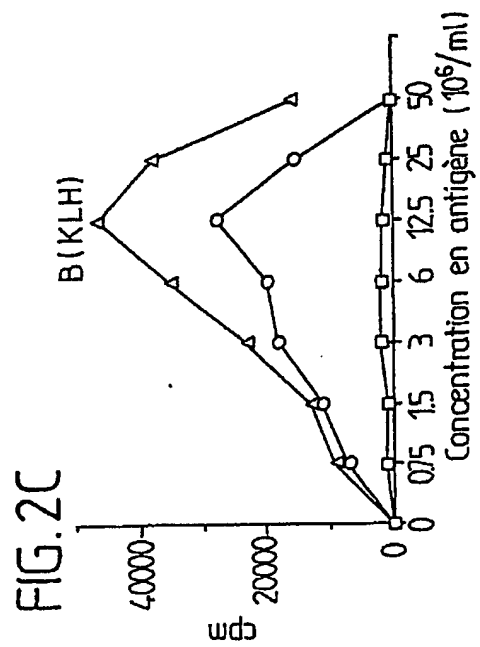
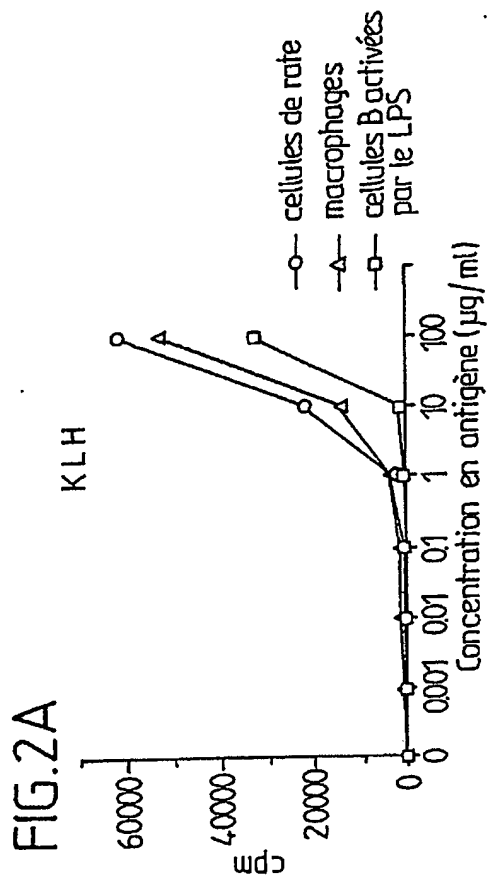
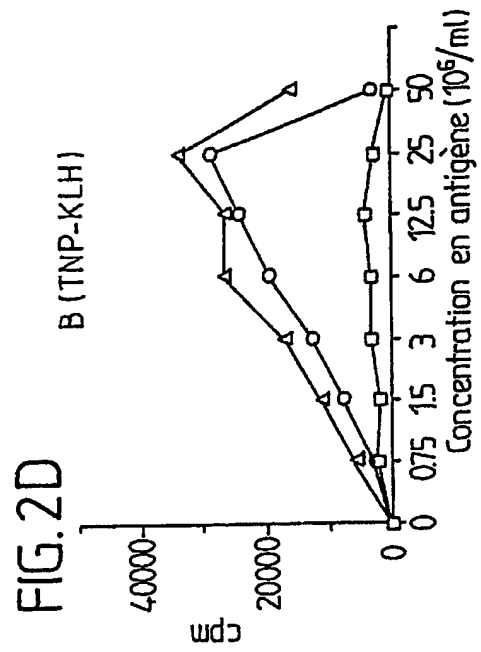
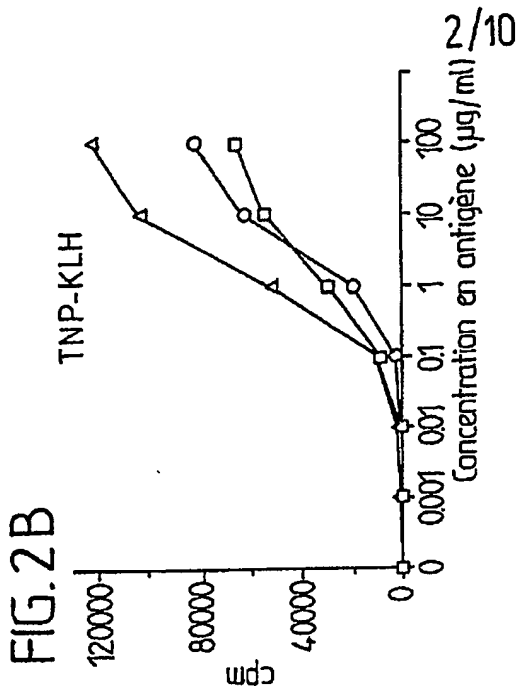


FIG.1



3/10

FIG. 3A

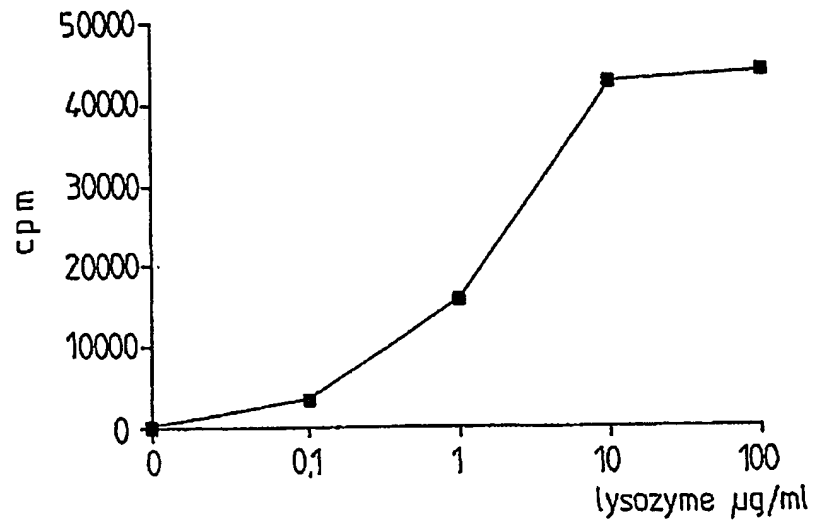
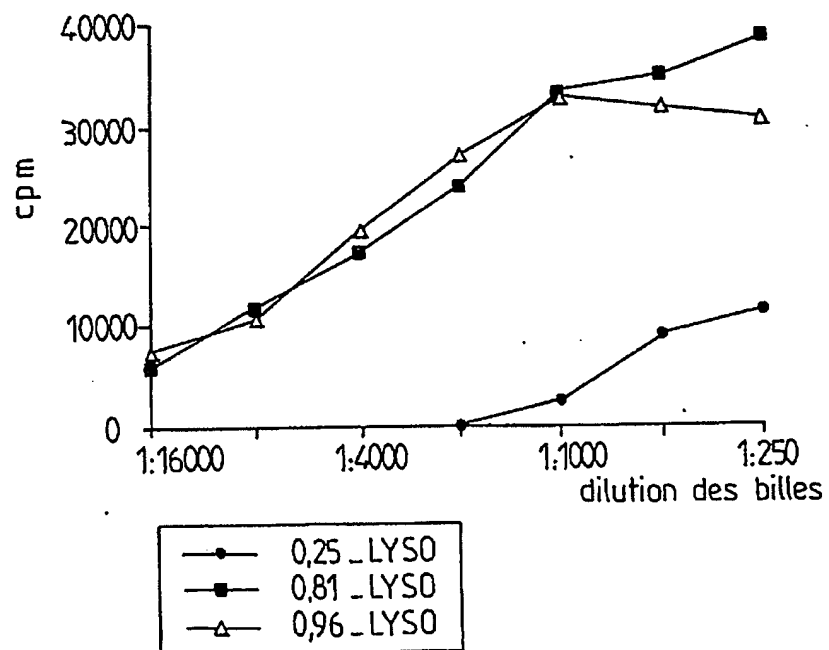


FIG. 3B



4/10

FIG. 4A

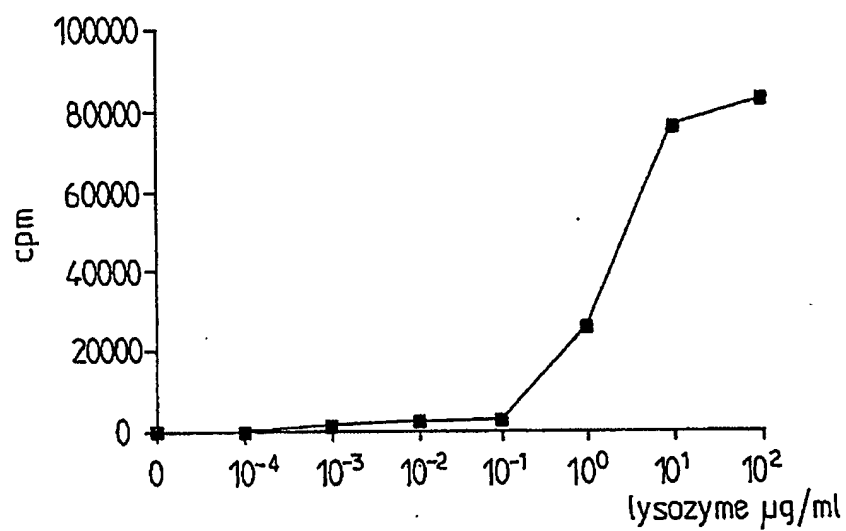
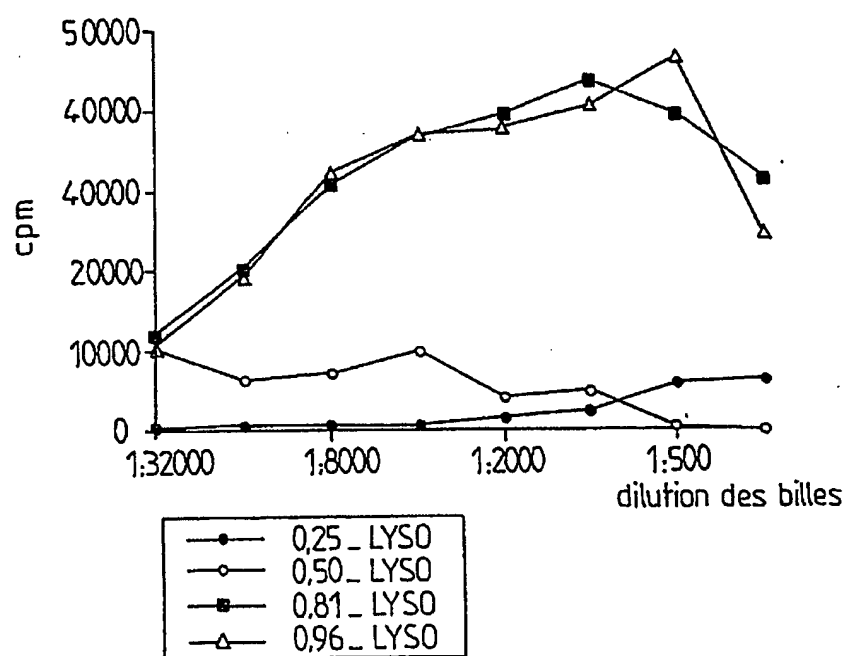


FIG. 4B



5/10

FIG. 5A

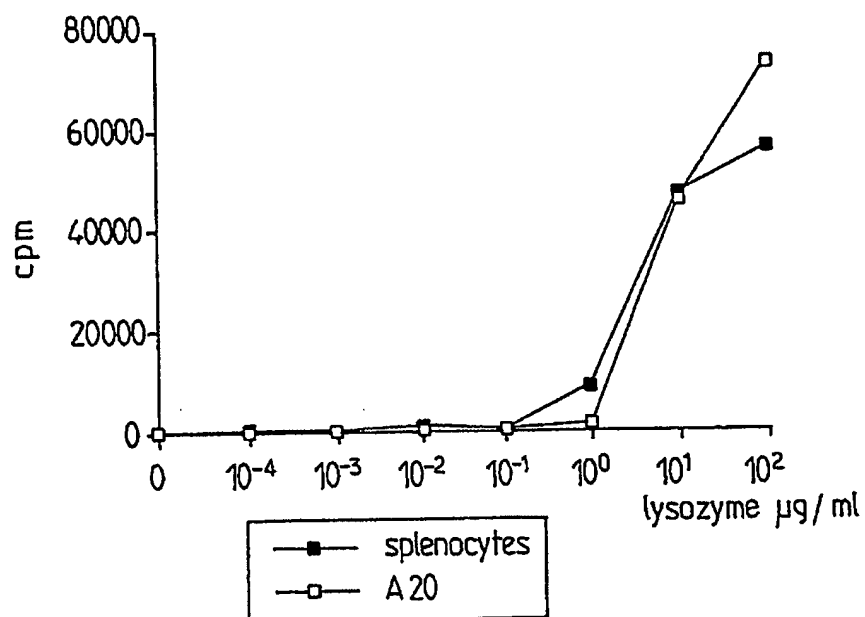
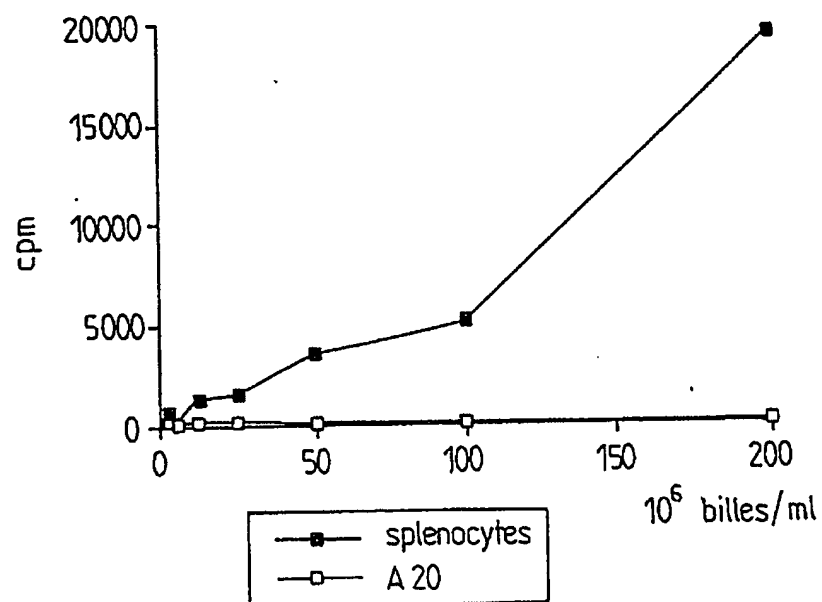


FIG. 5B



6/10

FIG. 6A

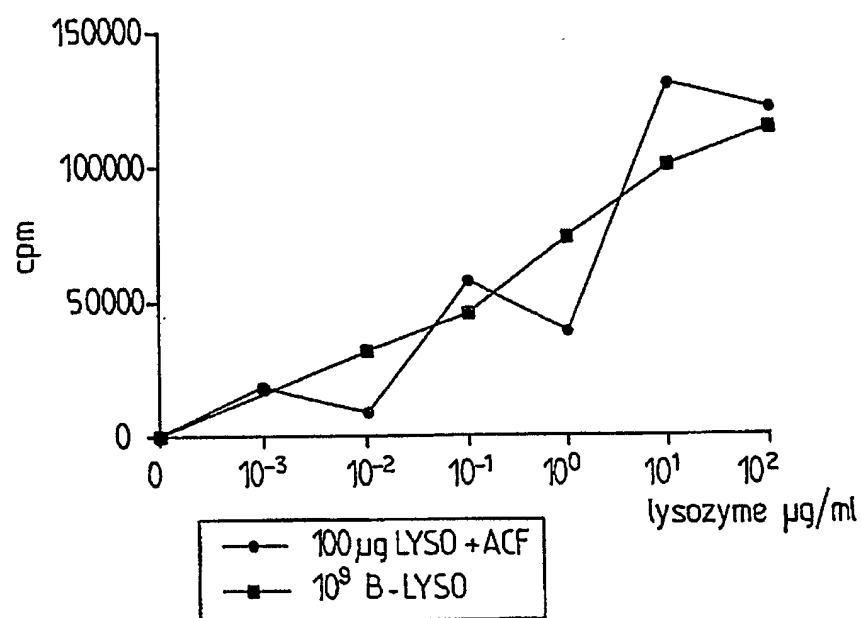
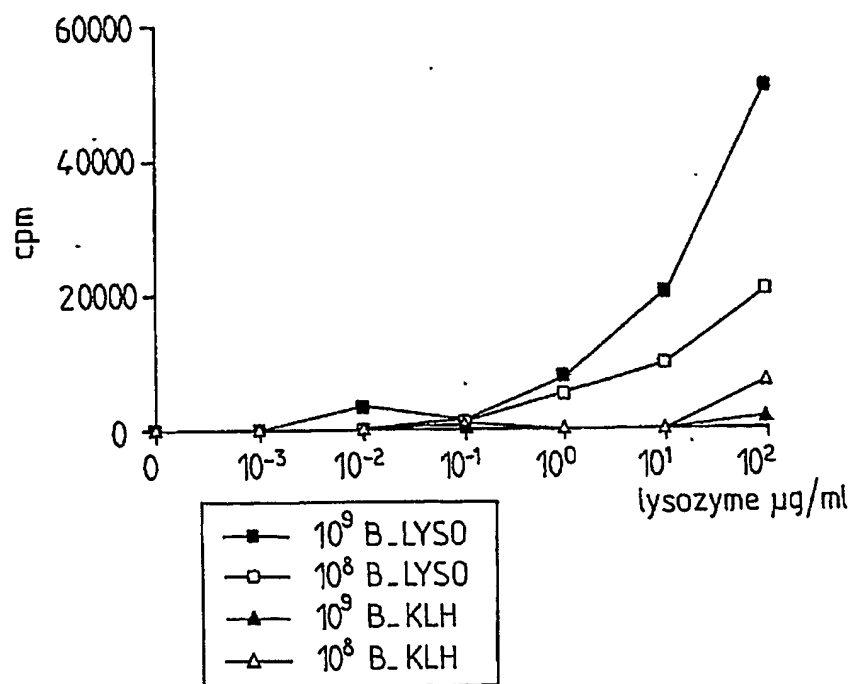


FIG. 6B



7/10

FIG. 7A

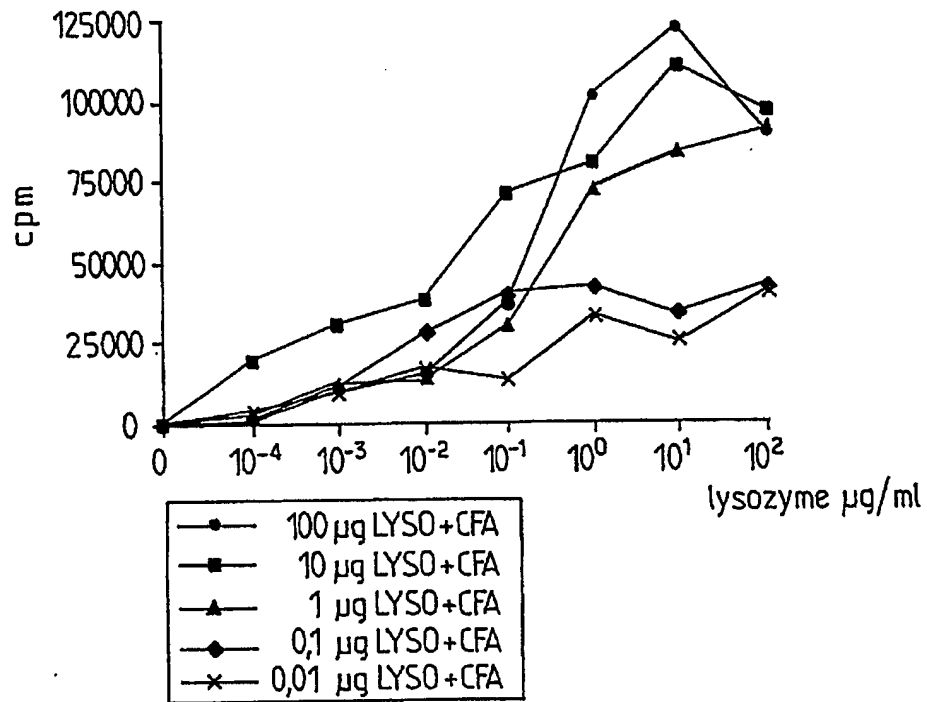
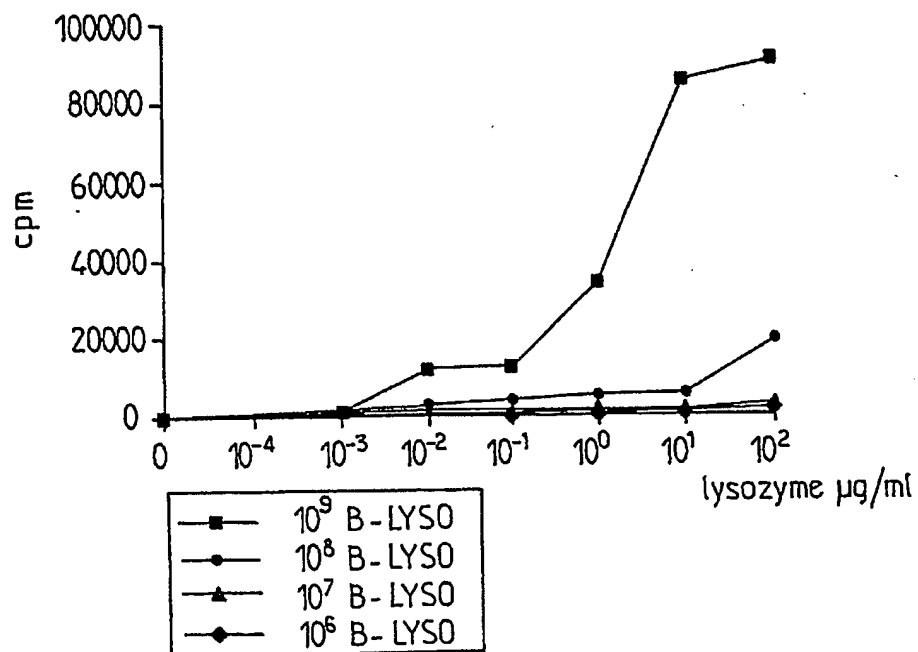


FIG. 7B



8/10

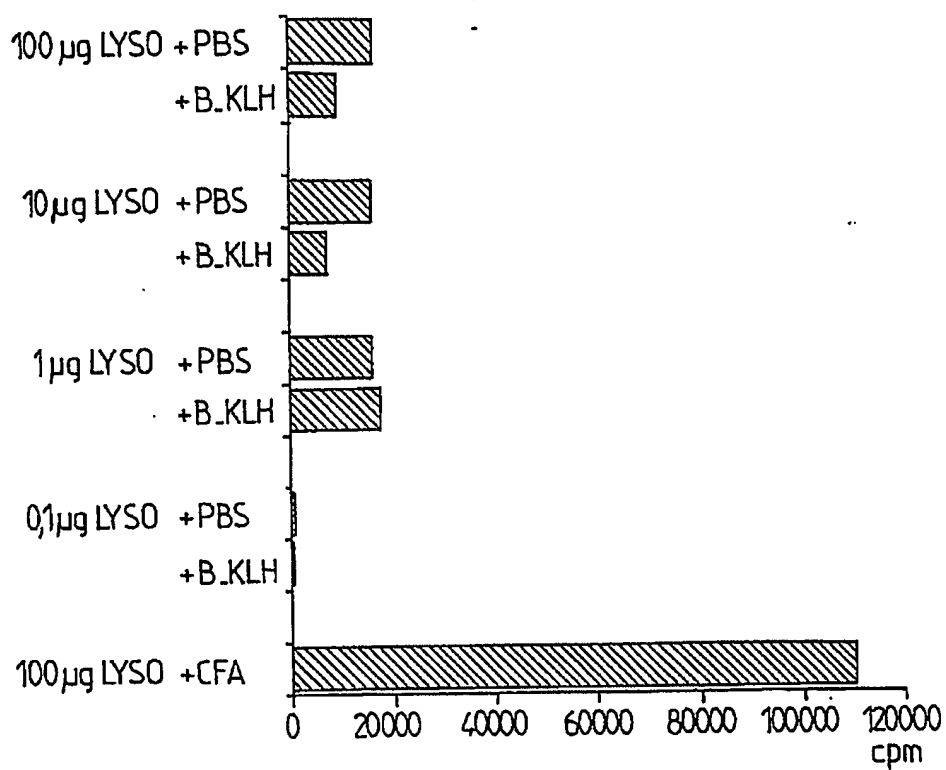


FIG. 8

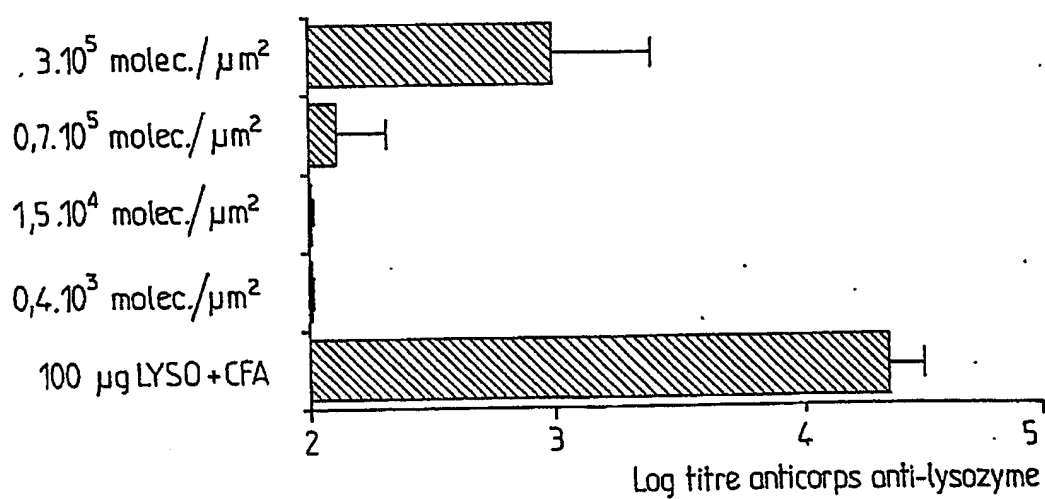
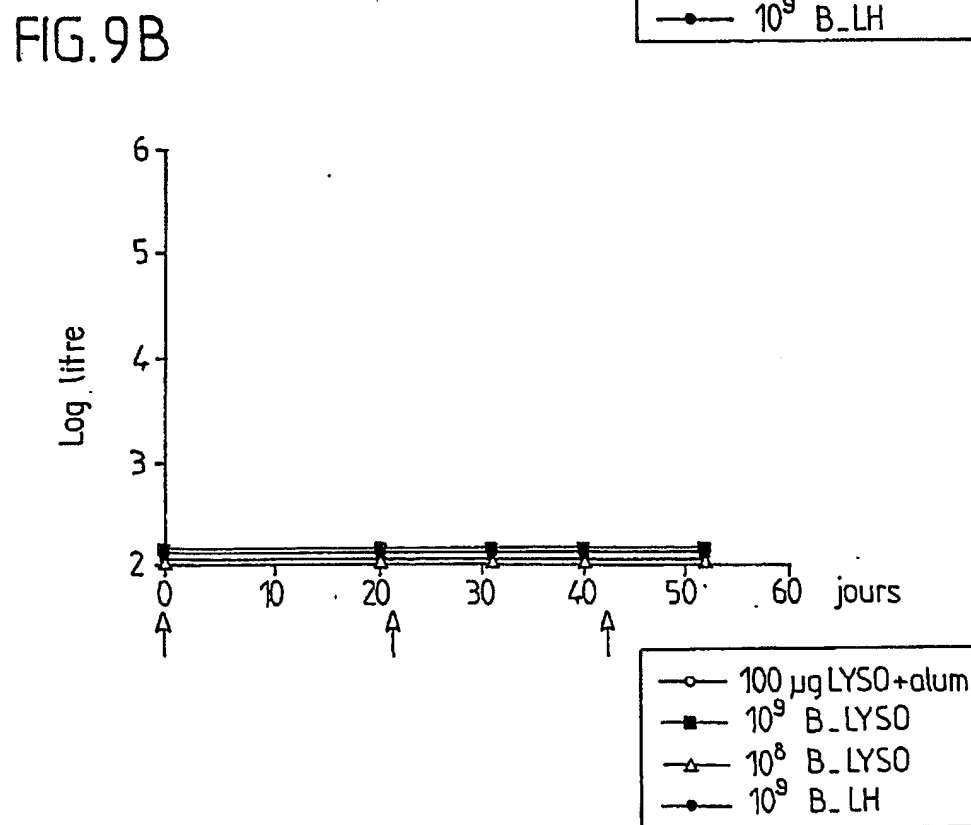
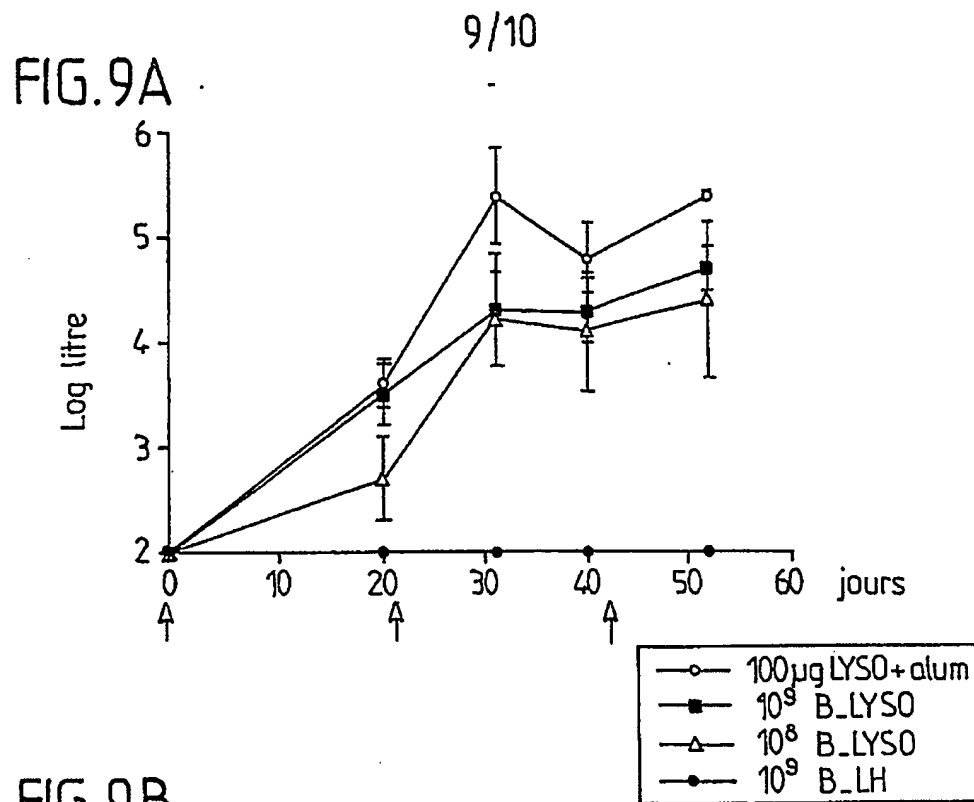


FIG. 11



10/10

FIG.10 A

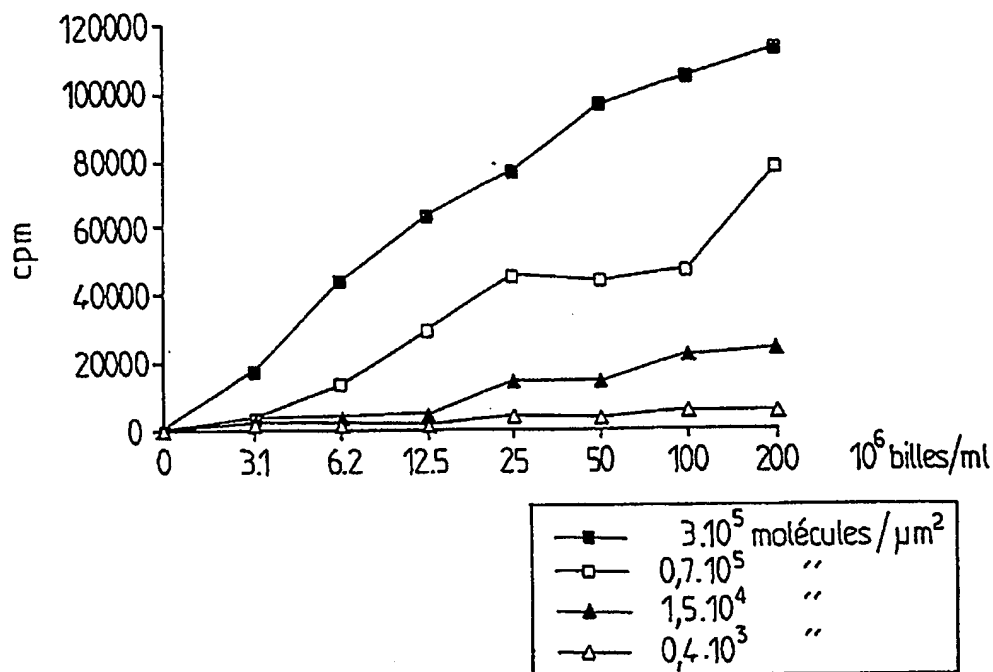
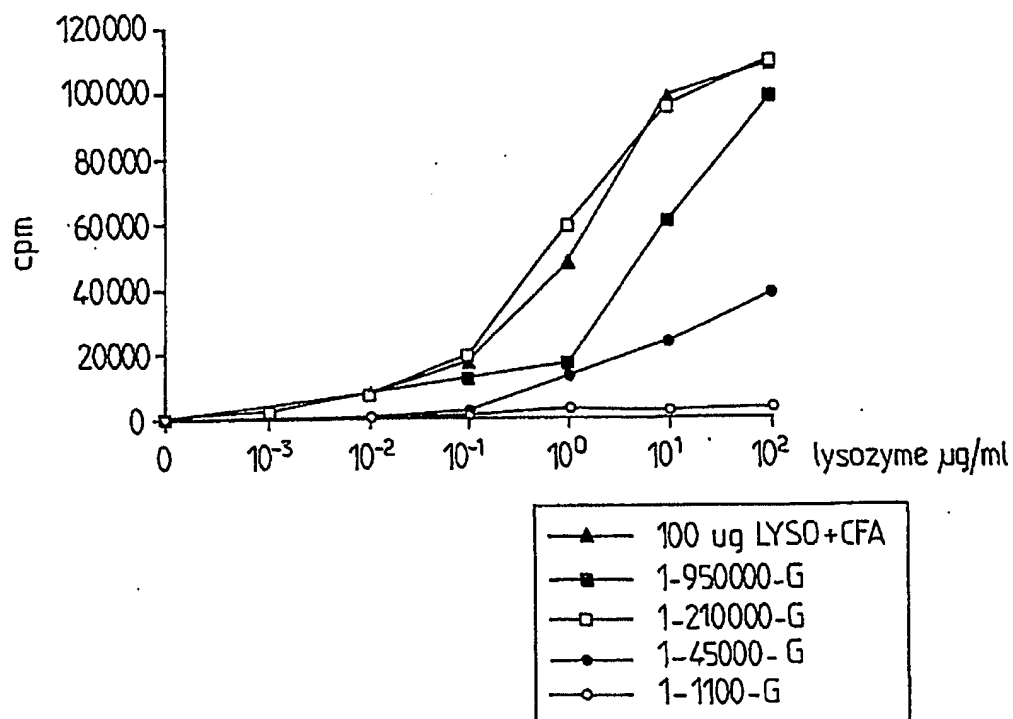


FIG.10 B



REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

25 JUIN 1993

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2695563

N° d'enregistrement
national

FR 9210879
FA 477022

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X,D	JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS vol. 52, no. 3, 1982, pages 341 - 351 A. REMBAUM ET AL. 'CELL LABELING AND MAGNETIC SEPARATION BY MEANS OF IMMUNOREAGENTS BASED ON POLYACROLEIN MICROSPHERES' * page 342, ligne 30 - page 343, ligne 31 *	14
X,D	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY vol. 17, Septembre 1987, pages 1287 - 1296 H. KIRK ZIEGLER ET AL. 'DIFFERENTIAL REQUIREMENTS FOR THE PROCESSING AND PRESENTATION OF SOLUBLE AND PARTICULATE BACTERIAL ANTIGENS BY MACROPHAGES.' L'article en entier.	14-16, 19-22
A	EP-A-0 465 081 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA)	
A	FR-A-2 304 326 (KREUTER JÖRG ET AL.)	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C07K A61K
Date d'achèvement de la recherche 09 JUIN 1993		Examinateur REMPP G.L.E.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 1503 (03.87) (P0413)